

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**PAPEL DE LA PROTEÍNA ADAPTADORA RIAM EN LA
FAGOCITOSIS MEDIADA POR COMPLEMENTO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Iria Medraño Fernández

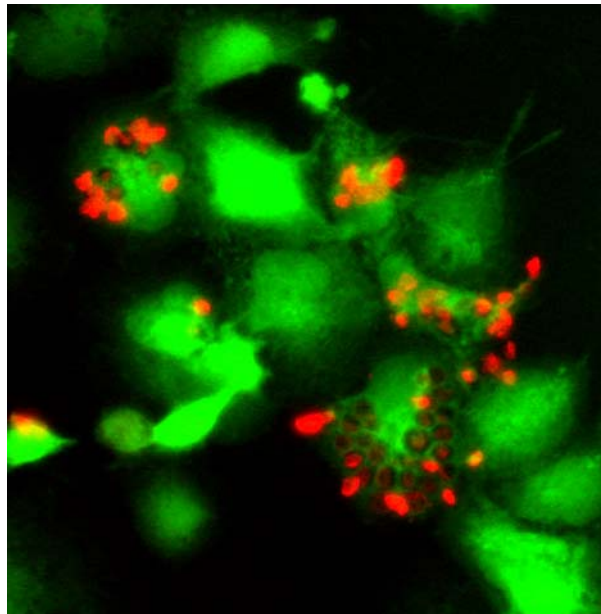
Bajo la dirección de los doctores

María Esther Lafuente Duarte
Carlos Cabañas Gutiérrez

Madrid, 2012

TESIS DOCTORAL

Papel de la proteína adaptadora RIAM en la fagocitosis mediada por complemento



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

Iria Medraño Fernández
Madrid, 2012



**Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Papel de la proteína adaptadora RIAM en la fagocitosis mediada por complemento

**Iria Medraño Fernández
Madrid, 2012**

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

TESIS DOCTORAL

Papel de la proteína adaptadora RIAM en la fagocitosis mediada por complemento

Vº Bº directores de tesis

María Esther Lafuente Duarte

Carlos Cabañas Gutiérrez



Pedro Antonio Reche Gallardo

Iria Medraño Fernández
Madrid, 2012

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-SO), bajo la dirección de los Doctores María Esther Lafuente Duarte, Pedro Antonio Reche Gallardo y Carlos Cabañas Gutiérrez

*A mi abuelo paterno, Miguel Medraño Franco,
porque siempre soñé que algún día yo también te
dedicaría un libro.*

AGRADECIMIENTOS

Pocas veces se tiene la oportunidad de agradecer tanto a tantísima gente y poder reflexionar así sobre las cosas importantes de tu vida. A todos, gracias por tener la ocasión de manifestar por escrito lo mucho que os debo de cómo soy. Gracias.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores, los Dres María Esther Lafuente Duarte y Carlos Cabañas Gutiérrez por creer en mí para confiarme el desarrollo de esta investigación. A Esther por tu amistad, por tener el privilegio de ser tu primera becaria y que hayamos aprendido juntas a lo largo de estos años y sobre todo por las incontables tardes de pensar ciencia juntas. A Carlos, por acudir al rescate de otra becaria más en apuros, por demostrarme que sabes apreciar el entusiasmo y el esfuerzo, y en definitiva, como ya dije una vez, por enseñarme que otra ciencia es posible.

A los Dres José Ramón Regueiro, Jose Manuel Martín-Villa, Eduardo Martínez Naves, Edgar Fernández Malavé, Manuel Gómez del Moral, María José Recio, Pedro Reche y Antonio Arnaiz, por haberme acogido en un departamento que es más que una familia. A Jose Manuel Quijano, porque aunque no es doctor, presencia le sobra. A Rosy, porque siempre te recibe con sus ojos sonrientes.

A mis patitos, Sara, que ya te me has hecho mayor y que siempre estás ahí y que sólo pienso en cosas buenas cuando pienso en ti (lofiu*), Javi, que serás tan gran científico como persona y tan buen fotógrafo como lejos dejes que te lleve esa curiosidad loca que tienes, y Dany, que en tan poco tiempo ya sabes que el primer camino para ganar mi corazón es a través del amor por lo que haces y, por supuesto, ¡por el estómago! También la pequeña Miriam, que siempre sonriendo ya tiene mucho camino andado. A los cuatro, por darme la maravillosa experiencia de enseñar, por descubrir mi verdadera vocación de entrenabecarios y por haberme dejado aprender tantísimo de cada uno de vosotros.

A todos los niños del departamento que más que compañeros son amigos: a Bea Garcillán, porque si tuviera que elegir a alguien para hacer el grupo de investigación perfecto allí estarías tú, como ejemplo de tesón y compañerismo, la perfecta combinación entre la cabezonería y la nobleza, mujer fuerte y valiente (¡sí, tú!) que vale mucho más de lo que piensa, a Miguel, por su buen humor, por esa guía de bares que dan comida gratis que vamos a hacer y por dar la siempre ágil contrapartida al ingenio para meternos con la Garcillán, a Carmen, por sus conversaciones y consuelos, por tener siempre una mano dispuesta a ayudarte a pesar de ser bioinformática (:P) y por ser la mejor embajadora que Asturias podría tener, a Juan, por ser siempre la voz de la razón cuando mayor es el caos, por su inestimable ayuda conceptual, y por haberme descubierto que la comida sin gluten puede estar tan sabrosa como la que comemos los demás, a Bea Abós, por ser un remanso de tranquilidad y por haberme brindado la primera sonrisa cuando llegué al departamento, a Vanesa, por sus respuestas contundentes y certeras y sus postres golosos y por toda su simpatía y comprensión, a Verónica, Sabela, Marina, AnaVi, Bruno, Dani, Laura, Diego y Couso,

todos vosotros también estáis en mi pequeño corazoncito. A Floppy, por ser el conejo más sorprendente del mundo, por haber aprendido a jugar al fútbol con cartones, y por darme sus anticuerpos para que pudiera empezar este trabajo.

A mis anteriores compañeros en otros centros, Alvarito y Susi (Farmacología y CBM), Jara, Javi, Ruth, Bricio, Ali, Patricia, Henar y Héctor (CBM), y Nacho, Alfredo, Olatz, Leyre, Gaizka, Pablito, David, Isa y Eli (CIB). Gracias por haberme ayudado siempre, por haberme dado ánimos, por haberme hecho sonreír y por escucharme en el momento de llorar, siempre me acordaré de vosotros.

A la Rubia, porque siempre serás la hermana que nunca tuve, porque estás a mi lado y te preocupas por mí incluso aunque no parezca necesitarlo. A Lorena, que es un poco como yo, porque su cariño y amistad es un regalo y porque creo en ti. A Eduardo, por sus bromas y chistes, por ser un hombre feliz y demostrarme que no hace falta tener mucho para ello, a Isidro, por sus abrazos y sonrisas y por salvarme de innumerables peligros en la cocina. A Elena, porque lo mejor de su mente prodigiosa es el corazón tan grande que tiene. A todos por ser mi familia cuando mi familia faltaba y porque nunca podré volver a pasar por la calle Trafalgar sin sentir algo de melancolía.

A mis pequeñuelos Estefa (la vitalidad, el color), Javi (la paciencia), Lou (la fidelidad), Olga (la escucha), Elena (el acogimiento), David (la inteligencia), Jesús, (la afabilidad) Paula (el cariño), Komax (el demonio), Feli (la resolución), Osmar (el ingenio), Jose (el arte), MeryJo (la correspondencia), Marta (el hogar), Miguel (la risa inesperada), Pache (los diálogos de cañas), Teresa (las conversaciones de madrugada), Manu Grande (la valentía), Alberto G (la amabilidad), Mary (el estilo incomparable), LoreLore (la frescura), Sebas (por sus mensajes desde El Bierzo) y Tony (el triunfo de lo bueno). Porque ser amigos y más que amigos, por hacer locuras, y viajes, y salidas nocturnas y diurnas. Por compartir conmigo un pequeño trozo de vuestra vida, y darme tantas cosas, tantas cosas que tendría que escribir una tesis sólo enumerándolas

A los chicos de Pan Bendito, María, Quique, no os olvido. Gracias por rescatarme de mi misma y enseñarme cuales son las cosas verdaderamente importantes. A los compañeros de Infraestructura de Sol y a los de la Asamblea Popular de Malasaña, porque me habéis reafirmado en las virtudes del ser humano y me habéis permitido comprobar que otro mundo es posible de verdad.

A mi familia, a vosotros que sois tan importantes y estáis tan lejos, a Alba, Adrián, Miguel y Laura, por hacerme estar siempre tan orgullosa de vosotros. A Cristina, Antonio, Rosa y Carlos, por haberme tratado siempre más que como una sobrina como una hija. A mi abuela Asunción, a la que echo siempre tantísimo de menos, que me ha enseñado a llevar la cabeza siempre alta y que es un ejemplo en todos los sentidos. A mi abuelo Miguel, que me hizo amar todo lo que ahora amo, los libros, el arte, los jardines encantados, Galicia.

A mi familia, a vosotros que sois tan importantes y estáis tan cerca. A mi tía Alfonsa, por su sonrisa y su generosidad, por su amor a la vida y por mostrarme lo risueña que aún me queda por ser. A Gonzalo, Rebeca, Lourdes, Lorena, Javier, Carlos y Laura, por

ser parte tan íntima de mi infancia y adolescencia, por las obras de teatro en navidad y los veranos en la playa, por ser vosotros mismos y caminar conmigo a lo largo de todos estos años. A Julio, Begoña, Carlos, Ana, Maricarmen y Antonio, porque todos me habéis dado mucho amor. A mi abuela, por su vitalidad y su alegría, por ser una mujer hermosa por dentro y por fuera. A mi abuelo, porque la dulzura siempre tendrá la forma de tus ojos tan azules.

A Alberto, mi pequeño mirlo, por dejarme construir con él el mejor nido que nunca podría soñar. Por ser mi compañero y amigo, por hacerme feliz, y por todas las cosas buenas que aún nos quedan por vivir juntos. A Theodor Wilburg, por ser la mejor bola de pelo que pueda guardar nuestra casa.

A mi madre, por ser tú, por creer en mí, por darme siempre todo tu amor sin condiciones, por haberme enseñado que la comprensión es la mejor virtud, porque todo esto es en parte para que puedas estar orgullosa de mí. Te quiero.

A mi padre, por convertirme en lo que soy, por servirme de ejemplo en la vida, por quererme sobre todas las cosas y por ser una persona tan maravillosa, porque todo esto es en parte para que puedas sentirte orgulloso de mí. Te quiero.

Al mundo, porque en general, todos soñamos las mismas cosas.

ABREVIATURAS

%A	<i>Association percentage</i> Porcentaje de asociación
%P	<i>Phagocytosis percentage</i> Porcentaje de fagocitosis
8'CPT	<i>8-pCPT-2'-O-Me-cAMP</i> 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP
ADAP	<i>Adhesion and Degranulation-Promoting Adapter Protein</i> Proteína adaptadora que promueve la adhesión y la desgranulación
AMPC	<i>Adenosine monophosphate cyclic</i> Adenosina monosfosfato cíclica
Arp2/3	<i>Actin-related protein 2/3</i> Proteína relacionada con la actina 2/3
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> Albúmina de suero bovino
BTK	<i>Bruton tyrosine kinase</i> Quinasa en tirosinas Bruton
C3G	<i>Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide releasing factor</i> Factor liberador de nucleótidos de guanina de unión al dominio SH3 de Crk
CaMKII	<i>Ca²⁺/Calmodulin kinase II</i> Ca ²⁺ /Calmodulina quinasa II
cDNA	<i>Complementary DNA</i> DNA complementario
CLR	<i>C-lectin receptor</i> Receptor de lectinas de tipo C
CD	<i>Cluster of differentiation</i> Clúster de diferenciación
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i> Proteína de control de división 42 homóloga
CMV	<i>Cytomegalovirus</i> Citomegalovirus
CR	<i>Complement receptor</i> Receptor de complemento

ABREVIATURAS

CRP	<i>C-Reactive protein</i> Proteína C reactiva
DAG	<i>Diacylglycerol</i> Diacilglicerol
DDAO	<i>Decyl dimethyl amine oxide</i> Óxido de decildimetilamina
DEP	<i>Dishevelled/EGL-10/Plekstrin</i> Dishevelled/EGL-10/Plekstrina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> Ácido desoxirribonucleico
ECL	<i>Electrochemiluminescence</i> Electroquimioluminiscencia
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	<i>Ethylenglycoltetraacetic acid</i> Ácido etilenglicoltetraacético
Epac	<i>Exchange protein activated by cAMP</i> Proteína de intercambio activada por AMPc
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> Quinasa regulada por señales extracelulares
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> Suero fetal bovino
FcR	<i>Fc receptor</i> Receptor fracción constante de inmunoglobulinas
FERM	<i>4.1/ezrin/radixin/moesin</i> 4.1/ezrina/radixina/moesina
fMLP	<i>formyl-methyl-leucil-phenylalanine</i> formil-metil-leucil-fenilalanina
FPR	<i>fMLP receptor</i> Receptor de fMLP
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i> Transferencia de fluorescencia por energía de resonancia
GAP	<i>GTPase-activating protein</i> Proteína activadora de GTPasas

ABREVIATURAS

GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i> Guanosina difosfato
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> Proteína verde fluorescente
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
GST	<i>Glutathione-S-transferase</i> Glutathion-S-transferasa
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i> Guanosina trifosfato
HBS	<i>HEPES buffered saline</i> Tampón salino basado en HEPES
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-pierazinoetanosulfónico
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> Factor de crecimiento de hepatocitos
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> Peroxidasa de rábano picante
IA	<i>Association index</i> Índice de asociación
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> Molécula de adhesión intercelular
ICAP-1α	<i>Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1α</i> Proteína asociada al dominio citoplasmático de las integrinas 1 α
Ig	<i>Immunoglobulin</i> Inmunoglobulina
IL	<i>Interleukin</i> Interleuquina
IP	<i>Phagocytosis index</i> Índice de asociación
IP₃	<i>Inositol triphosphate</i> Inositol trifosfato
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranoside</i> Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

ABREVIATURAS

LAD	<i>Leukocyte adhesion deficiency</i> Deficiencia de adhesión leucocitaria
LB	<i>Lysogeny broth</i> Medio de lisogenia
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> Antígeno asociado a la función de linfocitos 1
LPA	<i>Lisophosphatidic acid</i> Ácido lisofosfatídico
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> Lipopolisacárido
LTA	<i>Lipoteichoic acid</i> Ácido lipoteicoico
Mac-1	<i>Macrophage antigen 1</i> Antígeno de macrófagos 1
MARCO	<i>Macrophage receptor</i> Receptor de macrófagos
MBL	<i>Mannan-binding lectin</i> Lectina de unión a manosa
MDM	<i>Monocyte-derived macrophage</i> Macrófago derivado de monocito
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> Intensidad de fluorescencia media
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> Complejo mayor de histocompatibilidad
MRL	<i>Mig-10/RIAM/Lamellipodin</i> Mig-10/RIAM/Lamellipodin
Mst1	<i>Mammalian Sterile20-like protein 1</i> Proteína mamífera parecida a Sterile20
NK	<i>Natural killer</i> Natural killer
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i> Proteína con dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
p	<i>Statistical significance</i> Significancia estadística
PAF	<i>Platelet activator factor</i> Factor activador de plaquetas

ABREVIATURAS

PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> Patrón molecular asociado a patógenos
PAR	<i>Protease activated receptor/ thrombin receptor</i> Receptor activado por proteasas/receptor de trombina
PBMC	<i>Pheripheral blood mononuclear cell</i> Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> Tampón salino basado en fosfatos
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa
PD	<i>Pull-down</i> Pull-down
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGRP	<i>Peptidoglican recognition protein</i> Proteína de reconocimiento de peptidoglicanos
PH	<i>Plekstrin homology domain</i> Dominio de homología a plekstrina
PI4,5P₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate</i> Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PKA	<i>Protein kinase A</i> Proteína quinasa A
PKC	<i>Protein kinase C</i> Proteína quinasa C
PLC	<i>Phospholipase C</i> Fosfolipasa C
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i> Forbol miristato acetato
PMSF	<i>Phenylmethilsulfonyl fluoride</i> Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	<i>Proline rich domain</i> Dominio rico en prolina
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> Receptor de reconocimiento de patrones
PTB	<i>Phosphotyrosine-binding</i> Unión a fosfotirosinas

ABREVIATURAS

RA	<i>Ras-associated domain</i> Dominio de asociación a Ras
RA	<i>Retinoic acid</i> Ácido Retinoico
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i> Sustrato de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras
RalGDS	<i>Ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i> Estimulador de la disociación de nucleótidos de guanina Ral
Rap1	<i>Ras-related protein 1</i> Proteína relacionada con Ras 1
Ras	<i>Rat sarcoma protein</i> Proteína de sarcoma de rata
RBC	<i>Red blood cell</i> Eritrocito
RBD	<i>Ras binding domain</i> Dominio de unión a Ras
RIAM	<i>Rap1-GTP-interacting adaptor molecule</i> Molécula adaptadora que interacciona con Rap1-GTP
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> Ácido ribonucleico
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i> Proteín quinasa asociada a Rho
RQ	<i>Relative quantity (transcripts)</i> Cantidad relativa (tránscritos)
RT-PCR	<i>Real time PCR</i> PCR en tiempo real
SAP	<i>Serum amyloid protein</i> Proteína amiloide del suero
SARAH	<i>Sav/Rassf/Hpo domain</i> Dominio Sav/Rassf/Hpo
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SEM	<i>Standard error of the mean</i> Error estándar de la media
SH	<i>Src homology domain</i> Dominio de homología a src

ABREVIATURAS

shRNA	<i>Short hairpin RNA</i> Horquilla corta de RNA
SKAP55	<i>Src kinase-associated phosphoprotein</i> Fosfoproteína asociada a la quinasa src
SRA	<i>Scavenger receptor A</i> Receptor de tipo scavenger A
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i> Tirosin quinasa de bazo
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> Tampón salino basado en tris
TCR	<i>T cell receptor</i> Receptor de linfocitos T
TLR	<i>Toll-like receptor</i> Receptor de tipo Toll
TNF	<i>Tumoral necrosis factor</i> Factor de necrosis tumoral
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i> 12-tetradecanoil 13 acetato de forbol
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i> Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> Molécula de adhesión vascular 1
VLA	<i>Very late antigen</i> Antígeno de expresión muy tardía
WCL	<i>Whole cell lysate</i> Lisado celular total

ÍNDICE

Agradecimientos

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE	VIII
RESUMEN	XII

INTRODUCCIÓN..... 1

Inmunidad y fagocitosis.....	1
1.....	L
Las células fagocíticas	2
2.....	R
Reconocimiento de los patógenos	3
3.....	F
Fagocitosis	5
3.1.....	F
Fagocitosis mediada por los receptores de complemento	8
Integrinas, mecanismos de activación.....	10
1.....	E
Evolución y complejidad de la familia de las integrinas.....	10
2.....	M
Mecanismos de activación de las integrinas: la señalización ‘inside-out’	12
2.1.....	
Reajustes en los dominios intracelulares de las integrinas y relación con su activación	14
2.1.1.....	T
Tiralina	15
2.1.2.....	O
Otros reguladores de la activación de las integrinas: las kindlinas	19
2.2.....	
Transmisión de los reajustes intracelulares al dominio extracelular	19
3.....	S
Señalización ‘outside-in’ a través de las integrinas	20
4.....	L
La subfamilia de las integrinas leucocitarias en las funciones dependientes de adhesión	22
4.1.....	
Adhesión al endotelio y trans migración.....	22

4.2.	F
agocitosis	23
4.3.	S
upervivencia y proliferación	25
La pequeña GTPasa Rap1.....	26
1.	A
ctivación de Rap1	28
1.1.	R
egulación de la activación de Rap1	29
2.	E
xpresión y localización de Rap1	31
3.	I
mplicación de Rap1 en funciones biológicas	32
3.1.	I
mplicación de Rap1 en la adhesión celular	33
3.1.1.	R
ap1 controla la señalización ‘ <i>inside-out</i> ’ que activa a las integrinas	34
3.1.2.	T
alina en el mecanismo molecular de activación de las integrinas mediado por Rap1.....	35
3.1.3.	R
apL y RIAM como efectores en el mecanismo de activación de las integrinas por Rap1.....	37
3.1.4.	I
mplicación de Rap1 en procesos fagocíticos dependientes de integrinas	40
OBJETIVOS.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
1.	C
ultivo celular.....	44
1.1.	C
ultivo de la línea celular HL60	43
1.2.	C
ultivo de la línea celular THP-1	43
1.3.	C
ultivo de la línea celular HEK293T	43

1.4.	G
generación de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (MDMs, de <i>monocyte-derived macrophages</i>)	44
 2.	 S
silenciamiento de RIAM en los sistemas celulares utilizados.....	45
2.1.	T
transducción lentiviral	45
2.2.	T
transducción retroviral	46
 3.	 E
ensayos de expresión y activación de las integrinas	46
3.1.	E
ensayos de expresión de integrinas	46
3.2.	E
ensayos de activación de integrinas.....	47
 4.	 P
roducción de un anticuerpo policlonal frente a RIAM	48
 5.	 E
ensayos bioquímicos	50
5.1.	W
estern blot	50
5.2.	P
ull-down	51
5.3.	P
CR cuantitativa en tiempo real	51
 6.	 E
ensayos funcionales	52
6.1.	A
dhesión a fibrinógeno soluble	52
6.2.	E
nsayos de opsonización y fagocitosis	52
6.3.	I
nmunocitoquímica	53

6.4.	M
icroscopía confocal	54
7.	A
nálisis estadísticos	55

RESULTADOS56

1.	S
upresión estable de la expresión de RIAM en la línea celular promielocítica humana HL60 diferenciada al linaje granulocítico	56
2.	R
IAM regula la activación de la integrina $\alpha M\beta 2$ en respuesta a estímulos activadores de la fagocitosis.....	59
3.	R
IAM es una proteína esencial para la fagocitosis mediada por complemento en células HL60 diferenciadas al linaje granulocítico	63
4.	L
a fagocitosis mediada por complemento inducida por la activación de Rap1 requiere la expresión de RIAM en células HL60 diferenciadas al linaje granulocítico.....	67
5.	R
IAM es también esencial en la fagocitosis mediada por complemento en líneas celulares diferenciadas a macrófago	70
5.1.	L
ínea celular HL60 diferenciada a macrófago	70
5.2.	L
ínea celular THP-1 diferenciada a macrófago.....	73
6.	R
IAM es esencial para la fagocitosis mediada por complemento en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica	76

7.	E
I reclutamiento de talina a la copa fagocítica se ve disminuido en células HL60 diferenciadas al linaje granulocítico con la expresión de RIAM interferida	79
DISCUSIÓN	82
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	90
Resumen	90
Introducción	90
Inmunidad innata y fagocitosis	90
Integrinas, mecanismos de activación	92
La pequeña GTPasa Rap1	98
Materiales y métodos	104
Resultados	104
Discusión	105
Anexos	107
ANEXO	108

RESUMEN

La fagocitosis es el proceso fisiológico por el cual las células internalizan partículas de más de 0,5 micras de diámetro, entre las que pueden encontrarse material inorgánico, restos celulares, microorganismos, y células necróticas o apoptóticas. Los receptores fagocíticos pueden unir sus partículas diana de forma directa o de forma indirecta a través de opsoninas y pueden existir como receptores constitutivamente activos o cuya activación es inducida antes de la unión a sus dianas opsonizadas. Entre los receptores fagocíticos de actividad inducible destacamos los receptores de complemento CR3 y CR4, receptores de tipo integrina también conocidos como $\alpha M\beta 2$ (o Mac-1, o CD11b/CD18) y $\alpha X\beta 2$ (o p150,95, o CD11c/CD18). Tras la exposición de la célula fagocítica a distintos estímulos inflamatorios se inician cascadas de señales intracelulares que conllevan a la activación de estas integrinas fagocíticas y a la unión de sus ligandos, proceso conocido como activación *'inside-out'*. Los componentes centrales, descritos hasta el momento, en estas vías de activación *'inside-out'* comunes a distintos estímulos inflamatorios son: la pequeña GTPasa Rap1, cuya activación induce cambios en afinidad de estas integrinas, y la proteína citoesquelética talina, que es reclutada al dominio citoplasmático de la cadena $\beta 2$ del receptor induciendo un cambio conformacional que capacita a las integrinas fagocíticas para unir ligando.

En el presente trabajo doctoral hemos conseguido identificar a la proteína RIAM como un componente esencial en la vía de activación *'inside-out'* hacia las integrinas fagocíticas. RIAM (*Rap1-Interacting Adaptor Molecule*) fue descrita por nuestro grupo como una proteína efectora de Rap1 capaz de regular la afinidad de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ en linfocitos T ([Lafuente et al, 2004](#)). Nuestros datos indican que en las líneas celulares promieloleucémicas HL60 y THP-1 la interferencia estable de la expresión de RIAM afecta gravemente a su capacidad para fagocitar eritrocitos opsonizados con el complemento cuando las células son tratadas con estímulos inflamatorios, pero no a la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con IgGs. Es más, RIAM es esencial para transmitir señales de activación desde Rap1 a las integrinas. Así cuando en las líneas HL60 y THP-1 interferidas para RIAM activamos Rap1 por tratamiento con 8-pCPT-2-O-Me-cAMP, un análogo del AMPc que activa específicamente a Epac, una GEF específica de Rap1, observamos que la falta de expresión de RIAM inhibe la activación de la fagocitosis inducida por Rap1 activo. Del mismo modo, cuando se interfiere la expresión de RIAM mediante shRNAs en macrófagos derivados de monocitos sanguíneos, se observa una clara reducción en la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con el complemento. En megacariocitos, RIAM ha sido descrita como una molécula que recluta a talina a la cola citoplasmática de la integrina $\beta 3$ ([Han et al 2006](#)). Para determinar si RIAM opera de igual forma sobre los receptores del complemento, hemos estudiado si la falta de expresión de RIAM afecta al reclutamiento de talina a la cola fagocítica. Nuestros datos indican que un descenso en la expresión de RIAM correlaciona con una menor localización de talina en la zona de contacto de la membrana del fagocito con las partículas opsonizadas con complemento.

En suma, nuestros resultados sugieren que RIAM participa en la vía de señalización *'inside-out'* que regula la fagocitosis dependiente de complemento, que es el efector de Rap1 en dicha vía, y que su función es reclutar a talina a la cola citoplasmática $\beta 2$ de las integrinas $\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$.

INMUNIDAD INNATA Y FAGOCITOSIS

Alrededor de cada uno de nosotros pululan constantemente millones de agentes patógenos, entre bacterias, hongos, parásitos y virus, todos ellos con potencial para producir una infección que afecte más o menos severamente al organismo. Debido a ello, desde muy temprano en la evolución, los seres vivos han desarrollado mecanismos para identificar y eliminar a estos peligrosos elementos, diferenciándolos de los componentes propios frente a los que muestran tolerancia.

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa del organismo frente a microorganismos invasores. Este mecanismo de defensa está estereotipado en la naturaleza, ya que en exposiciones repetidas a una molécula o agente extraño se producen respuestas similares y de la misma intensidad, y está en su mayor parte enfocado a un conjunto limitado de determinantes microbianos compartidos por un gran número de patógenos ([Janeway, 1989](#)). Sin embargo, es el tipo de inmunidad más universal, ya que la mayor parte de los seres sobreviven exclusivamente gracias a los mecanismos innatos: tan sólo los vertebrados han desarrollado la inmunidad adaptativa como sistema complementario de reconocimiento y eliminación de agentes invasores. Las respuestas innatas se caracterizan, pues, por la carencia de un proceso de aprendizaje, esto es, por no poseer memoria inmunológica, y además, por tener una cinética rápida, proveyendo de una protección casi inmediata ante una infección. La inmunidad innata también desempeña diversas funciones importantes en la inducción de respuestas inmunitarias de tipo adaptativo, ya que el reconocimiento de un antígeno por los elementos del sistema inmune innato induce la expresión de moléculas coestimuladoras, citoquinas y quimioquinas, que reclutan y activan a los linfocitos antígeno específicos que componen este tipo de respuestas ([Medzhitov et al, 1997](#)). La inmunidad adaptativa, de este modo, aportaría la segunda línea de defensa frente a la entrada de organismos patógenos, a menudo en estadios más avanzados de la infección.

Los elementos centrales del sistema inmune innato han sido, en su mayor parte, fijados en el árbol de la vida hace cientos de millones de años, y por tanto, están ampliamente representados. Existe un gran consenso en cuanto a que cualquier “verdadero” sistema inmune, ya sea muy avanzado o primitivo, debe de ser capaz de realizar tres cosas:

1. Reconocer un amplio espectro de patógenos
2. Eliminar a esos patógenos una vez han sido reconocidos
3. Minimizar los efectos colaterales resultantes de dicha eliminación sobre los tejidos propios

Para ello, el sistema inmune innato comprende, en primer lugar, barreras externas (físicas, químicas y biológicas) que actúan como primer nivel de defensa, impidiendo la entrada de los microorganismos hacia el interior del organismo. En el supuesto de que el agente patógeno supere estas barreras, se produce la activación de los mecanismos innatos humorales y celulares, que tratan de evitar su establecimiento, desarrollo y acción. Entre estos últimos destaca la fagocitosis, proceso filogenéticamente conservado, mediante el cual los leucocitos y otras células ingieren ligandos particulados con tamaños superiores a 0,5 micras. A través de la ingestión de microbios patogénicos, los leucocitos fagocíticos cumplen dos funciones inmunes esenciales: primero, inician una vía de muerte de los microorganismos dirigiéndolos a lisosomas, ricos en enzimas hidrolíticas, y localizando el complejo fagocítico oxidasa al fagolisosoma; segundo, los leucocitos, en particular las células dendríticas, utilizan la fagocitosis para dirigir a los antígenos tanto al compartimento del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I, de *major histocompatibility complex*) como al del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) (Greenberg y Grinstein, 2002). De este modo, la fagocitosis tiene un papel dual: actuando como un mecanismo efector de la inmunidad innata y como un puente entre las respuestas inmunes adquiridas e innatas.

1. LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS

En vertebrados, la inmunidad innata es muy dependiente de las células de la estirpe mieloide, ya sean éstas móviles circulantes o residentes en tejidos. Se trata de células fagocíticas profesionales entre cuyas funciones se encuentran las de internalizar y destruir patógenos. En su mayor parte, estas células tienen capacidad de ejecución autosuficiente (por ejemplo, los neutrófilos son perfectamente capaces de matar bacterias *in vitro*), pero la evolución les ha llevado a ser aún más eficientes cuando actúan en conjunción con células y proteínas del sistema inmune adaptativo: un ejemplo sería la opsonización de agentes patógenos mediada por anticuerpos o la colaboración entre linfocitos T y macrófagos.

Las células mieloides incluyen fagocitos mononucleares y fagocitos polimorfonucleares. Los fagocitos mononucleares son los macrófagos, derivados de los monocitos sanguíneos, y emparentados cercanamente con las células dendríticas, algunas de las cuales, también de origen monocítico, se revelan como las principales presentadoras de antígeno a linfocitos T *naïve* del sistema inmune adaptativo. Los macrófagos se encuentran distribuidos a través de todo el organismo, en algunos casos (por ejemplo, en cerebro, corazón, pulmón e hígado) descansando entre el parénquima de órganos principales. Si un inóculo infeccioso consigue introducirse por cualquier ruta, probablemente un macrófago no ande lejos. Los macrófagos no son una población uniforme de células, entre ellas hay bastante diversidad morfológica, englobando el término tanto a los ahusados histiocitos, como a las achatadas células de Küpffer de los sinusoides hepáticos, y las células estrelladas de la microglía del sistema nervioso central. Los osteoclastos óseos también serían una forma de macrófago, o al menos, también son derivados de los monocitos sanguíneos. Los macrófagos son capaces de

internalizar y matar microbios, pero quizás sus funciones más importantes sean de supervisión. A través de la elaboración de citoquinas quimiotácticas, se encargan de reclutar otras células mieloides, y particularmente fagocitos polimorfonucleares, al lugar de la infección. Además, se cree que están implicadas en la homeostasis de tejidos en estado de reposo vía la eliminación de las células apoptóticas y la producción de factores de crecimiento (Geissmann et al, 2010).

Las células dendríticas también asumen una gran variedad morfológica y constituyen una población proporcionalmente muy pequeña de los fagocitos mononucleares, siendo divididas en células dendríticas clásicas, de origen monocítico, y células plasmacitoides, de origen linfoide. Las células dendríticas clásicas son células altamente especializadas en el procesamiento antigénico y la presentación, equipadas con una alta capacidad fagocítica como células inmaduras en su estadio de células inmaduras y una alta capacidad de producción de citoquinas como células maduras, siendo las encargadas de activar las respuestas de los linfocitos (Mellman y Steinman, 2001). Las células plasmacitoides, difieren de las dendríticas clásicas en que son células de vida relativamente larga y en que una proporción de las mismas presentan reordenaciones características de los genes de inmunoglobulinas (Corcoran et al, 2003). Estas células se especializarían en responder a infecciones virales con una producción masiva de interferones, aunque también pueden actuar como células presentadoras de antígeno y controlar respuestas de los linfocitos T (Colonna et al, 2004).

Los fagocitos polimorfonucleares, que comprenden a los granulocitos, neutrófilos, basófilos y eosinófilos, son de principal importancia en la contención de la infección. Los neutrófilos, en particular, son ejecutores especializados, dotados con un amplio espectro de armas con los que destruir a sus objetivos microbianos. Los eosinófilos y los basófilos están más implicados con la producción de mediadores que dan forma al entorno inflamatorio, y son receptivos a las citoquinas elaboradas por el sistema inmune adaptativo. El número de estas células es normalmente mucho menor que el de los neutrófilos, pero los eosinófilos, en concreto, pueden ser producidos en gran número durante infecciones de tipo parasitario, o como resultado de respuestas alérgicas mediadas por el sistema inmune adaptativo. Los mastocitos, descendientes de la línea mieloide que residen en los tejidos, juegan un papel similar a los macrófagos en la respuesta inflamatoria, ya que poseen receptores de anafilotoxinas y receptores de reconocimiento de patrones que activan procesos de producción de mediadores y citoquinas proinflamatorias. Además, como los eosinófilos, son importantes en las respuestas de tipo alérgico.

2. RECONOCIMIENTO DE LOS PATÓGENOS

La fagocitosis, que representa el mecanismo efector más importante de la respuesta inmune innata celular, es iniciada por el reconocimiento de patógenos por los receptores innatos. Estos receptores tienen repertorios redundantes para reconocer y responder a agentes infecciosos y no infecciosos. Las moléculas diana o ligandos de estos receptores son

componentes indispensables de los microbios, por lo que éstas no son fácilmente objetivo de mutaciones o selecciones que promuevan la evasión del sistema inmune innato.

Janeway propuso que estos receptores invariantes y codificados en la línea germinal, reconocen directamente a los patógenos y popularizó el concepto de “receptores de reconocimiento de patrones” (PRRs, de *Pattern Recognition Receptors*) (Janeway, 1989). La expresión de estos receptores no es clonal, como sucede con los receptores de la inmunidad adaptativa, ya que todos los receptores presentados en un tipo celular concreto tienen la misma especificidad (Medzhitov y Janeway, 2000). Los PRRs son capaces de reconocer estructuras concretas en los agentes patógenos, los llamados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, de *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), constituidos por estructuras moleculares conservadas en patógenos que no se encuentran presentes en eucariotas más evolucionados, lo que incluye peptidoglicanos, lipoproteínas, ácido lipoteicoico (LTA), lipopolisacárido (LPS), DNA que contenga motivos CpG y a la proteína flagelina, constituyente de los flagelos de muchas bacterias, entre otros.

Entre estos PRRs se encuentran los *toll-like receptors* o TLRs, unos receptores con gran homología a la proteína *Toll* de *Drosophila melanogaster*, componente de una vía de señalización que controla la polaridad dorsoventral en los embriones (Hashimoto et al, 1988), y que más tarde ha sido implicada en la respuesta inmune de moscas adultas (Lemaitre et al, 1996). Hasta la fecha se han descrito once TLRs en mamíferos, nueve de los cuales se expresan en humanos, algunos en las superficies celulares mientras que otros se expresan en membranas intracelulares, y se enumeran del 1 al 9 (Chuang y Ulevitch, 2001; Chuang y Ulevitch, 2000; Du et al 2000; Rock et al, 1998; Medzhitov et al, 1997). Cada TLR confiere la capacidad de reconocer un número discreto de ligandos; así, por ejemplo, el TLR2 es capaz de reconocer peptidoglicanos, lipopéptidos bacterianos y ácido lipoteicoico entre otros (Zarembek y Godowski, 2002; O’Neill, 2004). Algunos TLRs no sólo son capaces de reconocer bacterias y hongos, sino también protozoos (Campos et al, 2001) y virus (Hoebe et al, 2003). En el caso de los virus, los ácidos nucleicos parecen ser de importancia suprema en el desencadenamiento de la respuesta.

Otro tipo de PRRs, presentes en macrófagos, células dendríticas y leucocitos polimorfonucleares, lo constituye el grupo de receptores de lectinas de tipo C (CLRs, de *C-lectin Receptors*), presentes en macrófagos, células dendríticas y leucocitos polimorfonucleares. Estos CLRs, con la Dectin-1 como miembro más representativo, son capaces de reconocer

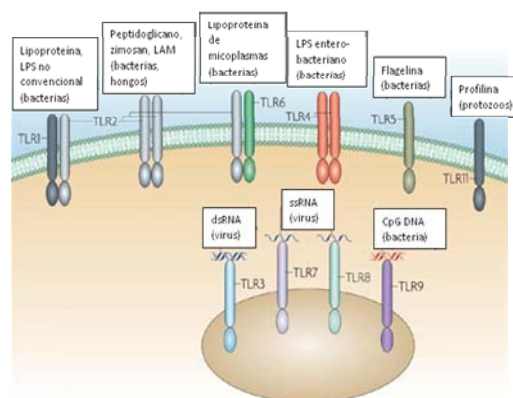


Figura 1.1: Localización y principales especificidades de los TLRs descritos en humanos (Adaptado de Kauffman, 2007)

y unirse a moléculas con estructura glucano presentes en patógenos, de forma independiente o cooperando con los TLRs.

La proteína de reconocimiento de peptidoglicanos (PGRP) es otra molécula de reconocimiento de patrones que juega un papel importante en la muerte intracelular de bacterias gram-positivas producida en neutrófilos (Dziarski et al, 2003; Kang et al, 1998). Existen cuatro isoformas conocidas de PGRP en mamíferos, de las cuales los neutrófilos expresan PGRP-S (siendo la *s* de *short*, proteína también conocida como PGLYRP1), proteína que une peptidoglicanos y bacterias gram-positivas (Liu et al, 2001), contribuyendo más a la actividad bactericida que al reconocimiento e ingestión (Liu et al, 2000).

Existen, además, otras moléculas que han sido identificadas como sensores microbianos. Por ejemplo, los receptores FPR1 y FPR2 son receptores acoplados a proteínas G que reconocen péptidos bacterianos formilados, como la f-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), y actúan como inductores importantes de la quimiotaxis durante la infección. Además, a proteínas intracelulares con motivos parecidos a proteínas defensivas de plantas, como NOD1 y NOD2, se les han atribuido funciones como sensores microbianos intracelulares (Girardin et al, 2003).

Cuando uno de estos receptores interacciona con sus ligandos, se inicia una cascada de señales intracelulares que culminan con la internalización del agente extraño y con la secreción de quimioquinas, que funcionan dirigiendo la migración celular, y atraen a los fagocitos desde el torrente circulatorio al sitio de la infección. Las células residentes activadas y los fagocitos también producen citoquinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), e interleuquinas (IL-1, IL-6, IL-8) que incrementan aún más la capacidad fagocítica de las células del sistema inmune innato y aumentan la movilización de precursores maduros desde la médula ósea. La acción de quimioquinas y anafilotoxinas lleva a la activación del endotelio vascular caracterizado por un incremento en la expresión de moléculas de adhesión que favorece el reclutamiento de leucocitos. Además, los cambios en la permeabilidad vascular favorecen el paso de proteínas plasmáticas y mediadores solubles con actividad antimicrobiana al lugar de la infección.

3. FAGOCITOSIS

La fagocitosis se ha definido tradicionalmente como un proceso dependiente de actina e independiente de clatrina que permite la internalización de partículas con tamaños superiores a 0,5 micras (Cardelli, 2001). Consiste en varias etapas que incluirían:

- i. Unión de la partícula a la superficie celular mediante su interacción con un receptor específico.

- ii. Activación de una vía de señalización que regula la formación espacio-temporal de F-actina.
- iii. Extensión de la membrana, dependiente de la polimerización de actina, para internalizar la partícula, y tráfico de vesículas desde compartimentos endolisosomales.
- iv. Retirada del recubrimiento de actina del fagosoma formado, seguido de reacciones de fusión y fisión para generar un fagolisosoma maduro.

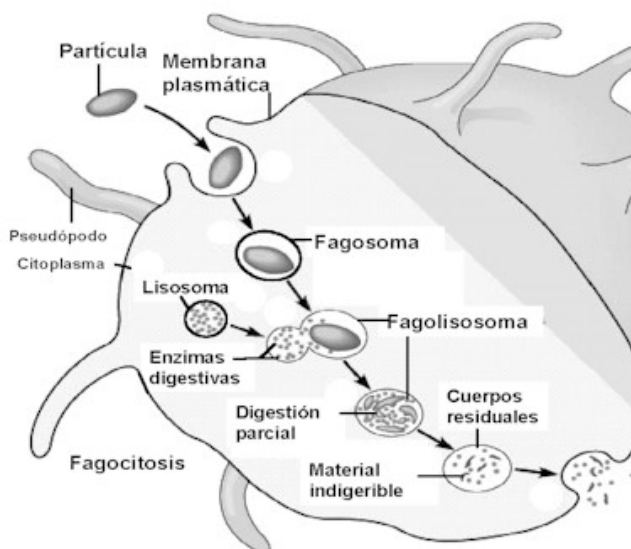


Figura 1.2: Pasos en la fagocitosis de un objetivo microbiano: 1. Adherencia de la partícula a la célula fagocítica, 2. Ingestión, 3. Formación del fagosoma, 4. Fusión del fagosoma con un lisosoma para formar un fagolisosoma, 5. Digestión enzimática del microbio ingerido, 6. Eliminación de los materiales residuales.

La captación de objetivos microbianos por fagocitosis es la parte principal de la función inmune innata de neutrófilos, macrófagos y otros leucocitos fagocíticos en mamíferos. Además, estos fagocitos profesionales, junto con otros tipos celulares como los fibroblastos, también son los encargados de eliminar células apoptóticas por fagocitosis, dentro del normal funcionamiento del organismo, siguiendo un proceso muy similar al de la fagocitosis de patógenos (Grimsley y Ravichandran, 2003; Aderem y Underhill, 1999).

La fagocitosis se desencadena por el reconocimiento de ligandos en la partícula a fagocitar a través de receptores en la superficie celular, que en último caso inicia una reorganización en el citoesqueleto de la célula fagocítica (Greenberg y Grinstein, 2002; Aderem y Underhill, 1999). Entre la gran variedad de receptores fagocíticos que existen (Tabla 1.1), los que se han caracterizado mejor son los receptores de inmunoglobulinas (FcR, de *Fc Receptors*) y los receptores de complemento (CRs, de *Complement Receptors*): aunque los PRRs tienen un papel primordial en el reconocimiento de microbios por los leucocitos, la eficiencia de la fagocitosis en estas células se encuentra marcadamente aumentada si éstos son previamente opsonizados con anticuerpos o componentes del sistema de complemento. Además, existe colaboración entre mecanismos de opsonización, ya que anticuerpos específicos reconocen epítopos en superficies microbianas y promueven la fijación de los componentes del

complemento a través de la vía de activación clásica del mismo. A partir de ambos tipos de receptores de opsoninas se inician cascadas de transducción de señales que conducen a la polimerización de actina bajo la superficie de contacto, que se cree es la fuerza líder para la extensión de membrana alrededor de la partícula. La ingestión produce que el objeto de la fagocitosis sea atrapado en una vesícula intracelular denominada fagosoma que se transporta al interior de la célula y va madurando a través de una serie de fusiones de membrana con vesículas lisosomales para convertirse en un fagolisosoma, donde la partícula fagocitada es destruida por un complejo conjunto de enzimas líticas y especies reactivas de oxígeno (como radicales libres) y nitrógeno, producidos en el interior de la célula (Stuart y Ezekowitz, 2005).

Tabla 1.1: Receptores fagocíticos (*Adaptación de Underhill y Ozinsky, 2002*)

Receptores que participan en fagocitosis	Ligandos en partículas opsonizadas	Referencias
<i>Receptores Fc:</i>		
- FcγRI (CD64)	IgG, CRP, SAP	Bharadwaj et al, 2001; Mold et al, 2001; Ravetch et al, 2001; Bharadwaj et al, 1999
- FcγRII (CD32)	IgG, CRP, SAP	
- FcγRIII (CD16)	IgG, CRP, SAP	
- FcεRI	IgE	Raghavan y Bjorkman, 1996
- FcεRII (CD23)	IgE	Richards y Katz, 1991
- FcαRI (CD89)	IgA	van Spriël et al, 1999
<i>Receptores de complemento:</i>		
- CR1(CD35)	MBL, C1q, C4b, C3b	Ghiran et al, 2000
- CR3 (CD11b/CD18)	iC3b	Ehlers, 2000
- CR4 (CD11c/CD18)	iC3b	Ross et al, 1992
<i>Diversas integrinas:</i>		
- α5β1 (CD49e/CD29)		
- α4β1 (CD49d/CD29)	Fibronectina/vitronectina	Blystone y Brown, 1999
- αVβ3 (CD51/CD61)		
<i>Receptores scavenger:</i>		
- SRA	Bacterias, LPS, LPA	Platt y Gordon, 2001
- MARCO	Bacterias	van der Laan et al, 1999
<i>Receptores de manosa</i>	Manosa	Ezekowitz et al, 1990
<i>Dectina-1</i>	B1,3-Glucano	Brown y Gordon, 2001
<i>CD14</i>	LPS, Peptidoglicano	Dziarski et al, 1998; Schiff et al, 1997
<i>C1qR(P)</i>	C1q, MBL, SAP	Nepomuceno et al, 1997

CRP=Proteína C Reactiva; SAP=Proteína amiloide del suero; MBL=Lectinas de unión a manosa; LPS=Lipopolisacárido; LPA=Ácido lipoteicoico

Aunque la internalización de la partícula en una vacuola derivada de membrana es el resultado final en ambos casos, el proceso que subyace en esta internalización no es idéntico en los eventos derivados tras la fagocitosis vía FcRs y vía receptores de complemento. El reconocimiento de ligandos a través de receptores de complemento desencadena una forma de fagocitosis dependiente de la pequeña GTPasa Rho, caracterizada por el hundimiento de la partícula en la célula sin la producción de mediadores proinflamatorios y sin requerimiento de la tirosina quinasa Syk (Underhill y Ozinsky, 2002; Aderem et al, 1985), distinguible física y molecularmente de la fagocitosis que se produce a través del reconocimiento mediado por los FcR, una vez se ha activado la respuesta inmune adaptativa, ya que en este caso se induce la activación de Rac1 y Cdc42, dos GTPasas de la familia de Rho, se requiere la actividad de Syk, y se produce la formación de pseudópodos que rodean y en último caso atrapan a la partícula que se fagocita (Caron, 2003; Caron y Hall, 1998). En este trabajo nos centraremos en la fagocitosis dependiente de complemento.

3.1. Fagocitosis mediada por los receptores de complemento

Los receptores de complemento fagocíticos incluyen al receptor del complemento 1 (CR1 o CD35) expresado en eritrocitos, linfocitos B, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y células dendríticas, al receptor de complemento 3 (CR3, integrina $\alpha M\beta 2$, Mac-1 o CD11b/CD18), que se encuentra en monocitos, macrófagos, neutrófilos, otros granulocitos, células dendríticas y células NK, y el receptor de complemento 4 (CR4, integrina $\alpha X\beta 2$, gp150/95, o CD11c/CD18), que aún no ha sido tan bien caracterizado como los otros dos. El receptor de complemento 2 (CR2 o CD21) no se ha descrito como un receptor fagocítico, sino que participa en el reconocimiento del antígeno por los linfocitos B, formando parte del complejo correceptor de los mismos.

El receptor de complemento CR1 es una proteína transmembrana de tipo no integrina con un dominio extracelular grande de reconocimiento de ligandos similares a la lectina y una cola corta intracelular (Ghiran et al, 2000). CR1 se une a un amplio espectro de opsoninas microbianas como los componentes del complemento C1q, C4b y C3b, así como a lectinas de unión a manosa (MBL, de *mannan-binding lectins*) (Ghiran et al, 2000; Klickstein et al, 1997). Aunque este receptor se adscribe, en general, a fagocitosis, tiene más bien una función de adherencia a la partícula, más que una función internalizadora como el CR3 y el CR4 (Fällman et al, 1993).

Los receptores de complemento CR3 y CR4 son integrinas que, cuando pasan a una conformación activada, inician la fagocitosis a través del reconocimiento del fragmento del complemento iC3b. El entrecruzamiento de los receptores conduce a la activación de la pequeña GTPasa RhoA (Caron y Hall, 1998), que se une a su efector ROCK y éste a su diana la miosina II, con lo que regulan el complejo Arp2/3 y la acumulación de F-actina en la zona de contacto de la partícula (Olazabal et al, 2002), produciéndose en último caso la internalización

de la partícula. Las citoquinas inflamatorias (TNF α), los productos microbianos (LPS) y la adhesión (por ejemplo a fibronectina), estimulan la fagocitosis a través del CR3, demostrando cómo de heterogéneos pueden ser los procesos celulares que comprenden la fagocitosis (Wright y Griffin, 1985; Pommier et al, 1983). *In vitro*, la fagocitosis mediada por el CR3 puede ser estimulada con ésteres de forbol, sugiriendo que la activación de la proteína quinasa C (PKC) está implicada en dicho proceso (Aderem y Underhill, 1999; Wright y Griffin, 1985).

La activación de los receptores de complemento CR3 y CR4 requiere una estimulación denominada en inglés señalización *'inside-out'* ("desde dentro hacia fuera"), mediante la cual determinadas señales intracelulares generadas a través de la activación de otros receptores de superficie celular van finalmente a inducir cambios conformacionales en estas integrinas, produciendo su activación. Se ha descubierto recientemente que esta activación de las integrinas es llevada a cabo por la pequeña GTPasa Rap1, ya que la expresión de un mutante de Rap1 constitutivamente activo es suficiente para activar a estos receptores de complemento para la fagocitosis, mientras que un mutante de Rap1 dominante negativo bloquea la fagocitosis a través de estos receptores aún en presencia del éster de forbol PMA capaz normalmente de activar a Rap1 a través de la PKC (Caron, 2003).

INTEGRINAS, MECANISMOS DE ACTIVACIÓN

Las integrinas son receptores glicoproteicos transmembrana constituidos por heterodímeros compuestos de una subunidad o cadena α y otra β unidas no covalentemente, que median adhesión celular célula-célula y célula-matriz extracelular. Desde el establecimiento de la familia de receptores de integrinas hace más de veinte años (Hynes, 1987), estas moléculas se han convertido en los receptores de adhesión celular sobre los que se ha alcanzado mayor comprensión: las integrinas y sus ligandos tienen un papel esencial para el desarrollo normal del organismo, ya que estas moléculas controlan la adhesión celular, la migración y el ensamblaje de la matriz extracelular (Huttenlocher et al, 1996; Wu et al, 1995), su activación está implicada en angiogénesis (Byzova et al, 2000) y metástasis de tumores (Felding-Habermann et al, 2001), y su desregulación implica un mal funcionamiento del desarrollo embrionario (Martín-Bermudo et al, 1998), perjudica a la función cardíaca (Keller et al, 2001) y a la respuesta inmune y al tráfico leucocitario (McDowall et al, 2003). Tomando todo esto en conjunto, podemos afirmar que el control celular de la activación de las integrinas juega un papel fundamental en la salud y la enfermedad a través del desarrollo y durante el curso de toda la vida adulta del individuo.

Cada una de las subunidades que componen los heterodímeros de integrinas contiene un dominio extracelular grande, de más de setecientos residuos y subdividido en varios dominios estructurales, un dominio transmembrana único, de más de veinte residuos, y usualmente un dominio citoplasmático corto, con excepción de la cadena β_4 , de entre trece y setenta residuos. Los dominios extracelulares unen una amplia variedad de ligandos mientras que los dominios intracelulares citoplasmáticos permiten el anclaje a proteínas del citoesqueleto. De esta forma, el exterior y el interior de una célula se encuentran físicamente conectados, lo que permite una transmisión bidireccional de señales mecánicas y bioquímicas a través de la membrana plasmática y conduce a una regulación cooperativa de las funciones celulares entre los dos entornos (Qin et al, 2004).

1. COMPLEJIDAD DE LA FAMILIA DE RECEPTORES DE INTEGRINAS

La familia de integrinas en mamíferos comprende, hasta el momento, 8 subunidades β y 18 subunidades α que se ensamblan entre sí para formar 24 integrinas distintas. Además de las subfamilias ancestrales que reconocen laminina y RGDs, los vertebrados poseen un conjunto de receptores de colágeno, α_1 , α_2 , α_{10} y α_{11} , cada uno asociado con la subunidad β_1 , y un par

de integrinas relacionadas entre sí, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 9\beta 1$ que reconocen tanto proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina, como receptores de superficie celular pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, como VCAM-1 (Hynes, 2002).

Los vertebrados también tienen un conjunto de integrinas leucocitarias específicas que se caracterizan por compartir una subunidad β de tipo $\beta 2$ (CD18) que se asocia no covalentemente con cuatro tipos posibles de cadena α (Sánchez-Madrid et al, 1983). Esta subfamilia, conocida como las integrinas leucocitarias, está constituida por la integrina $\alpha L\beta 2$ (CD11a/CD18 o LFA-1), la integrina $\alpha M\beta 2$ (CD11b/CD18 o Mac-1), la integrina $\alpha X\beta 2$ (CD11c/CD18 o p150,95) y la integrina $\alpha D\beta 2$ (CD11d/CD18). Estas integrinas tienen papeles cruciales en varias funciones leucocitarias claves para la contención y eliminación de infecciones, como pueden ser la colaboración entre leucocitos, la extravasación leucocitaria y la fagocitosis.

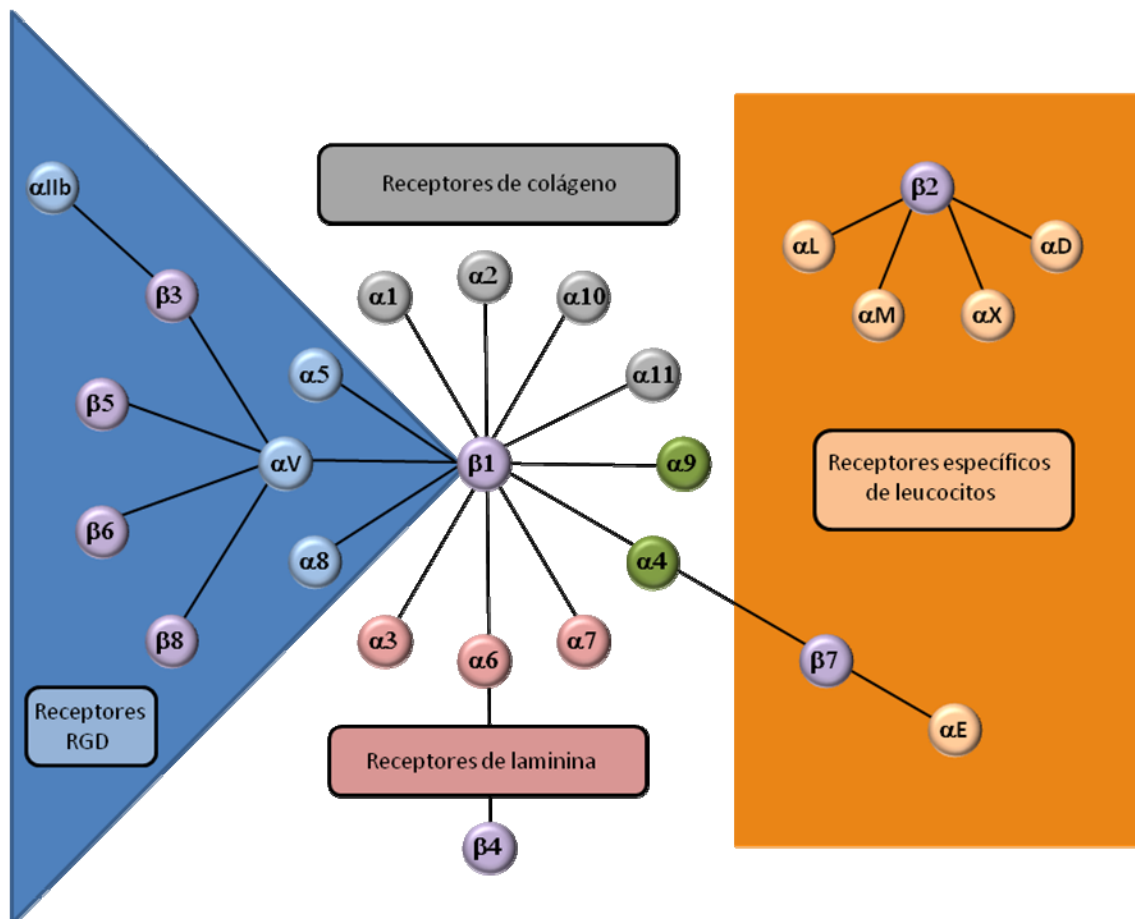


Figura 2.1: La familia de receptores de integrinas en mamíferos: la figura muestra las asociaciones entre subunidades α y subunidades β ; 8 subunidades β se asocian con 18 subunidades α para formar hasta 24 integrinas distintas. Pueden considerarse varias subfamilias en función de relaciones evolutivas (reflejado en el color de las subunidades α), especificidad de ligando y, en el caso de las integrinas $\beta 2$ y $\beta 7$, expresión restringida a leucocitos. Las subunidades α con especificidad por lamininas (rosa) o RGD (azul) se encuentran en todos los metazoos y son claramente de origen más antiguo (Adaptado de Hynes, 2002)

2. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE LAS INTEGRINAS: LA SEÑALIZACIÓN 'INSIDE-OUT'

Las integrinas se expresan en la superficie celular en un estado inactivo o “apagado” en el que no unen ligandos y no señalizan hasta que una estimulación externa a la célula las lleva a una forma de alta afinidad, un evento rápido y reversible que es capaz de influenciar la adhesión celular (revisado por Luo et al, 2007; por Kinashi y Katagiri, 2004; por Qin et al, 2004). Este concepto de regulación de la función de la integrina se ha denominado tradicionalmente señalización ‘inside-out’, ya que la información viaja desde el interior de la célula hacia el exterior, e implica una separación de las colas citoplasmáticas de las cadenas α y β previa, que termina por inducir un cambio conformacional de los dominios extracelulares (Hynes, 2002; Liddington y Ginsberg, 2002). Esta forma de señalización y los cambios en afinidad que conlleva, se encuentran regulados en el tiempo y en el espacio de forma precisa, lo cual es fundamental para el correcto funcionamiento de procesos tan importantes como pueden ser la agregación plaquetaria (Shattil et al, 1998) o la transmigración leucocitaria (Hogg et al, 2002), dos situaciones en las que una activación prolongada de las integrinas puede causar males mayores al organismo.

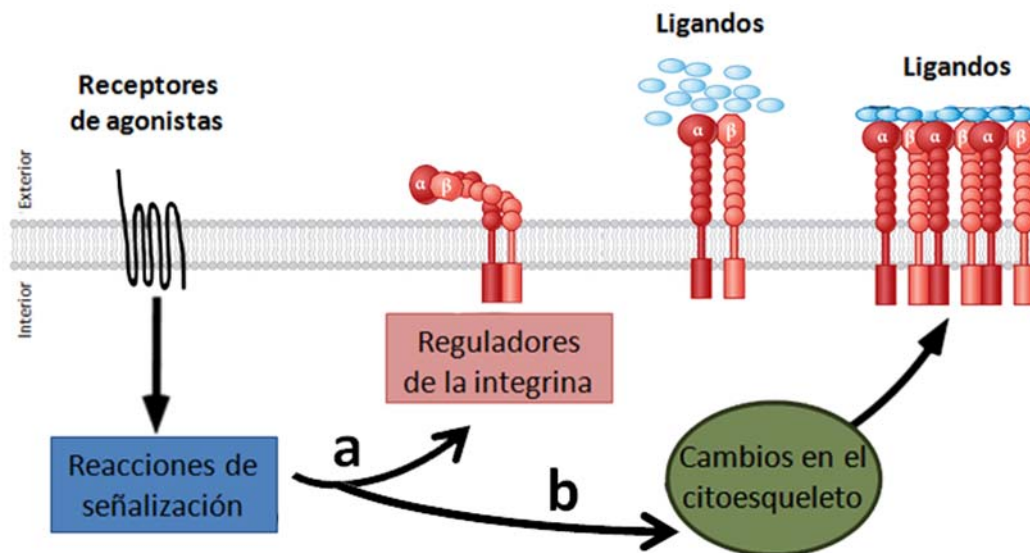


Figura 2.2: La señalización de tipo ‘inside-out’ implica que señales procedentes del exterior de la célula activen vías de señalización intracelulares que producen la unión de proteínas reguladoras de la actividad de la integrina a las colas citoplasmáticas de las mismas induciendo un cambio de conformación que se transmite a través del dominio transmembrana y que capacita, de este modo, a las integrinas para unir ligando. La señalización de tipo ‘inside-out’ es capaz tanto de incrementar la afinidad (a) como la avidéz (b) (Adaptado de Al-Awgati, 2011, y de Shattil et al, 1998)

Las integrinas pueden adoptar tres estados de activación: una forma doblada incapaz de unir ligando, una extendida, pero no completamente abierta con una capacidad intermedia de unir ligando, y una conformación abierta y extendida con alta afinidad por el ligando (Abram y Lowell, 2009; Evans et al, 2009). Excelentes estudios y revisiones han discutido el equilibrio dinámico entre los diferentes estados de conformación (Luo y Springer, 2006; Mould y Humphries, 2004; Humphries et al, 2003; Takagi et al, 2002), pero es justo concluir que los reajustes globales que se producen en la conformación de la integrina acompañando a la señalización 'inside-out' aún no están completamente esclarecidos (Banno y Ginsberg, 2008; Luo et al, 2007). Es por esto que el desentrañamiento del mecanismo molecular exacto de la activación de las integrinas constituye un reto para la investigación actual y es un prerrequisito para nuevas aproximaciones terapéuticas, incluyendo terapia génica (Nussbaum et al, 2010).

Además de sufrir cambios en su afinidad tras la activación, las integrinas activas típicamente se agrupan en el plano de la membrana formando oligómeros (*clustering*), esto es, la interacción de subunidades α consigo mismas y subunidades β entre sí, pertenecientes a distintos heterodímeros (Li et al, 2003), siendo esta modulación de la avidéz un modelo perfectamente compatible con los modelos de modulación de afinidad en cuanto a la adhesión celular: ambos sucesos no son mutuamente excluyentes y usualmente ocurren en concierto (Hato et al, 1998); es más, la activación de la integrina y el *clustering* pueden estar mecánicamente relacionados de forma que la activación, en combinación con la ocupación de sitios que produce el ligando, también estimula la agrupación de integrinas (Li et al, 2003; Erb et al, 1997; Isenberg et al, 1987).

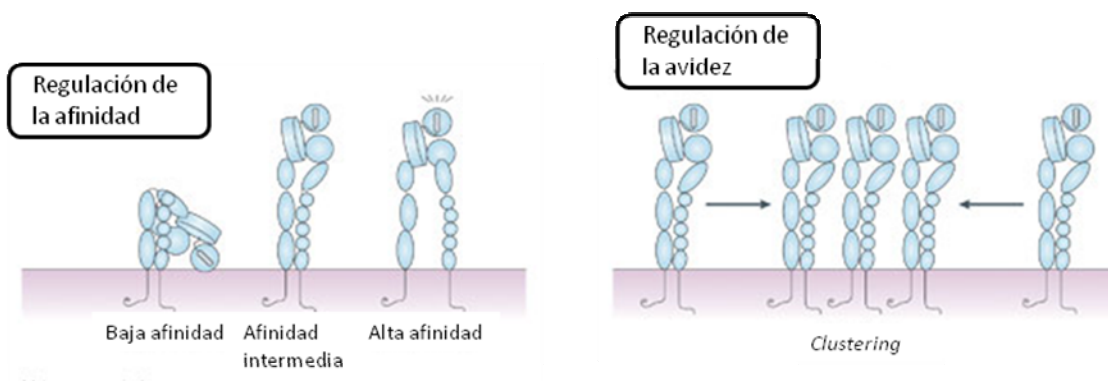


Figura 2.3: Modelos de afinidad y avidéz. La parte izquierda muestra las diferentes conformaciones de una integrina relacionadas con los distintos estados de afinidad: la forma doblada de baja afinidad, y las dos extendidas con afinidades intermedia y alta según la separación de sus colas citoplasmáticas. Las señales de activación intracelulares son las que inducirían los cambios entre las distintas conformaciones. A la derecha se muestra el *clustering* de las integrinas sobre la superficie celular, lo que permitiría interacciones multivalentes con los ligandos (Adaptado de Kinashi, 2005)

2.1. Reajustes en los dominios intracelulares de las integrinas y relación con su activación

Los cambios en las interacciones y/o en las estructuras de los dominios citoplasmáticos de las integrinas en las regiones conservadas próximas a la membrana juegan papeles cruciales en la activación de las integrinas a través de la señalización *'inside-out'* (Calderwood, 2004; Liddington y Ginsberg, 2002; Hughes et al, 1995). Esta afirmación se sustenta en la comprobación de que mutaciones puntuales tanto en la cola de la cadena α como en la de β en estas zonas o deleciones de todo el conjunto citoplasmático resultan en la activación constitutiva de las integrinas (Hughes et al, 1995; O'Toole et al, 1994).

Se cree que la interacción entre las regiones próximas a la membrana de las subunidades α y β se encuentra estabilizada por un puente salino entre un residuo de arginina conservado en la cola citoplasmática de α con un residuo de aspartato, también conservado, en la cola de β y por los residuos hidrofóbicos inmediatamente situados en la zona N-terminal de estos dos residuos (Hughes et al, 1995; O'Toole et al, 1994). Esta asociación entre las cadenas α y β es la que se considera que previene la activación de la integrina estabilizando la conformación inactiva y, por tanto, su estado de baja afinidad (Ginsberg et al, 2005; Calderwood, 2004; Liddington y Ginsberg, 2002). Por otro lado, se ha comprobado que la deleción de secuencias de la cadena β fuera del bloque próximo a la membrana inhibe la activación, habiéndose identificado regiones específicas de la cola β importantes para que dicha activación se produzca (Wang et al, 1997; Hughes et al, 1995; O'Toole et al, 1995; O'Toole et al, 1994; Hibbs et al, 1991a; Hibbs et al 1991b), de tal forma que mutaciones en ellas, por ejemplo en los motivos conservados NPXY, pueden bloquear la activación de la integrina e inducen cambios estructurales en estas zonas y en la región próxima a la membrana (Ulmer et al, 2001). Es más, las mutaciones en estos motivos NPXY perturban la unión de numerosas proteínas citoesqueléticas y señalizadoras a las colas β (Liu et al, 2000). La cola α contribuiría a la activación de las integrinas de forma específica según el tipo celular, ya que la deleción de los residuos que siguen a la secuencia GFFKR inhiben la adhesión específica inducida por agonistas del tipo celular en el que se expresan de las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha L\beta 2$ (Tohyama et al, 2003; Weber et al, 1997; Kassner y Hemler, 1993; Kawaguchi y Hemler, 1993). En el caso de la integrina $\alpha IIb\beta 3$, una porción de la cola de la cadena αIIb situada inmediatamente C-terminal a la secuencia GFFKR conservada, interactúa con la cola $\beta 3$ para inhibir la formación de una conformación activa (Ginsberg et al, 2001). Las mutaciones en esta secuencia alteran la conformación de la cola α (Vinogradova et al, 2000) y producen la activación de la $\alpha IIb\beta 3$ (Leisner et al, 1999). En resumen, las regiones próximas a la membrana de las colas citoplasmáticas de las cadenas α y β jugarían papeles cruciales en el control de la activación de las integrinas, probablemente a través de la interacción de una con la otra para estabilizar una conformación inactiva. Las regiones más distales a la membrana de las colas β regularían la activación a través de interacciones con proteínas específicas que afectarían a la interacción $\alpha\beta$ próxima a la membrana, mientras que las secuencias α situadas en la zona más distal a la membrana regularían la conformación de la cola β y la asociación con proteínas activadoras de una forma específica del tipo celular (Calderwood, 2004).

En base a esto, la unión de la proteína adaptadora talina al motivo NPxY más próximo a la membrana del dominio citoplasmático de la cadena β , se ha revelado como un evento final crucial en la activación de varias clases de integrinas (Tadokoro et al, 2003; Calderwood et al, 2002; Calderwood et al, 1999), lo que ha sido confirmado para las integrinas de tipo $\beta 1$ (Kuo et al, 2006), $\beta 2$ (Lim et al, 2007) y $\beta 3$ (Tremuth et al, 2004).

A	
$\alpha 1$	LALW KIGFFKR PLKKMEK
$\alpha 2$	AILW KLGF FKRKYEMTKNPDEIDETTELSS
$\alpha 3A$	LLLW KCGFF KRARTRALYEAKRQKAEMKSPSETERLTDDY
$\alpha 4$	YVMW KAGFF KRQYKSILQEENRRDSWSYINSKSNDD
$\alpha 5$	YILY KLGF FKRSLPYGTAMEKAQLKPPATSDA
$\alpha 6A$	FILW KCGFF KRNKDHYDATYHKAIEHAQPSDKERLTSDA
$\alpha 7$	LLLW KMGFF KRAKHPEATVPQYHAVKIPREDRQPFKEEKTGTILRNWGSPPREGPDAPILAADGHPGLGPDGHPGPGTA
$\alpha 8$	LALW KCGFF DRARPPQEDMTDREQLTNDKTPEA
$\alpha 9$	VLLW KMGFF RRRYKEIEAEKNRKENEDSWDVQKNQ
$\alpha 10$	FCLW KLGF FAHKKIPPEEKREEKLEQ
$\alpha 11$	LALW KLGF FSARRRREPGLDPTPKVLE
αV	FVMY RMGFF KRVPRPQEEQEREQLQPHENGEGNSET
αL	IVLY KVGFF KRNLEKMEAGRGVPNGIPAEDSEQLASGQEAGDPGCLKPLHEKDSSEGGGKD
αM	AALY KLGF FKRQYKDMMEEGGPPGAEPQ
αX	AVLY KVGFF KRQYKEMMEEANGQIAPENGQTPTSPSPSEK
αD	ATLY KLGF FKRHKEMLEDKPEDTATFSGDDFSCVAPNVPLS
$\alpha 1b$	LAMW KVGFF KRNRPPEEDEDEEGE
αE	VILF KCGFF KRKYQLNLESIRKAQLKSENLEEN
B	
$\beta 1A$	LLIW KLLMI THDRREFAKFEKEKMAK W DTGENPIYKSAVTTVV-----NPKYEGK
$\beta 2$	LVIW KALIH LSDLREYRRFEKEKLKS Q WNNND-NPLFKSATTTVM-----NPKFAES
$\beta 3$	LLIW KLLIT ITHDRKEFAKFEEERARAK W TANNPLYKEATSTFT-----NITYRGT
$\beta 5$	LAIW KLLVT ITHDRREFAKFQSESRAR Y EMASNPLYRKPISTHTVDFTFNKFNKSYNGTVD
$\beta 6$	LCIW KLLVS FDHREKFAKFEAERSKAK W QTGTNPLYRGSTSTFK-----NVLYKHREKQKVDLSTDC
$\beta 7$	VLAY RLSVE ITHDRREYSRFEKEQQQLN W KQDSNPLYKSAITTTI-----NPRFQEADSPTL

Figura 2.4: Alineamientos de las colas citoplasmáticas de las integrinas **(A)** corresponde a las cadenas α y **(B)** corresponde a las β . La interfaz entre las regiones citoplasmáticas y transmembrana se asume generalmente que recae entre los residuos conservados W/Y y K, que se muestran en negrita. Los residuos incluidos en la caja verde corresponden a aquellos que experimentalmente se ha determinado que están situados en la bicapa lipídica. Los residuos próximos a la membrana e importantes para la formación del puente salino entre las cadenas α y β , GFFKR en la cadena α y DxxE en la cadena β , aparecen en rojo. Los residuos conservados en la cadena β implicados en la unión a talina se indican como sigue: el motivo proximal NPxY se muestra en azul, mientras que el triptófano conservado (W) aparece en rosa. En la parte más distal a la membrana se ha marcado, también en azul, el segundo motivo conservado NPxY, importante para la unión de otras proteínas reguladoras de la actividad de la integrina distintas de la talina (Adaptado de Calderwood, 2004)

2.1.1. Talina

La talina es una proteína citoesquelética que colocaliza e interacciona con las integrinas y que une F-actina y proteínas relacionadas con la actina como la vinculina (Campbell y Ginsberg,

2004; Tadokoro et al, 2003; Calderwood et al, 2002; Calderwood et al, 1999). La talina, como las integrinas, ha demostrado ser esencial para el desarrollo embrionario en ratón (Monkley et al, 2000), *Drosophila* (Brown et al, 2002) y *C. elegans* (Cram et al, 2003). Tanto en *Drosophila* como en *C. elegans*, la deficiencia en talina genera fenotipos similares a aquellos producidos por la deficiencia en integrinas, indicando que la talina actúa en la misma vía o está íntimamente relacionada en su función con las integrinas *in vivo*.

Por otro lado, la supresión de la expresión de talina mediante el uso de RNAs de interferencia ha revelado que la talina es esencial para la activación de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ en una gran variedad de tipos celulares (Tadokoro et al, 2003). Notablemente, en megacariocitos (precursores de plaquetas), la supresión de la talina previene la activación de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ que debería suceder tras la activación con agonistas fisiológicos. La talina media la activación celular de la integrina mediante su unión a las colas citoplasmáticas de la cadena β , y el bloqueo de esta interacción, bien por mutaciones en talina bien en la cola $\beta 3$, inhiben dicha activación (Tadokoro et al, 2003). Este requerimiento por talina no puede ser eludido por el uso de agonistas fisiológicos ni por la expresión de otras proteínas con potencial para activar a las integrinas (Tadokoro et al, 2003). Por tanto, la unión de talina a las colas β de las integrinas es un paso final esencial para que se produzca la activación de la integrina.

La talina está formada por un homodímero antiparalelo constituido por dos subunidades de unos 270 KDa, cada una de las cuales contiene un dominio N-terminal en forma de cabeza globular de unos 50 KDa, y un dominio C-terminal en forma de varilla, de unos 220 KDa (Critchley, 2000). Se ha mostrado que esta proteína tiene capacidad para unirse fuertemente a las colas de las integrinas $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 5$, y de forma más débil a la de la integrina $\beta 7$ (Calderwood et al, 2003; Calderwood et al, 1999; Pfaff et al, 1998; Sampath et al, 1998; Knezevic et al, 1996). El principal lugar de interacción con la integrina se encuentra en la cabeza globular de la talina (Yan et al, 2001; Calderwood et al, 1999; Patil et al, 1999) y cuando son sobreexpresados, los únicos fragmentos de talina que son capaces de activar a las integrinas son aquellos que contienen este lugar de unión (Calderwood et al, 2002; Calderwood et al, 1999).

La cabeza globular de la talina posee un dominio de tipo FERM (4.1/ezrina/radixina/moesina) (Calderwood et al, 2002). Los dominios FERM comprenden tres subdominios, F1, F2 y F3, y a menudo median interacciones con las colas citoplasmáticas de proteínas transmembrana (Pearson et al, 2000). Los subdominios de talina F2 y F3 son capaces de unirse específicamente a las colas de las integrinas β , siendo la afinidad con F3 cuatro veces mayor que la de F2 (Calderwood et al, 2002). Es más, la expresión del subdominio F3 de la talina, pero no la de F2 o la de otras proteínas de unión a la cola β que tienen alta afinidad con ella, es la causa de la activación de $\alpha IIb\beta 3$ (Calderwood et al, 2002). De este modo, el principal fragmento de unión y activación de las integrinas estaría constituido por los noventa y seis residuos del subdominio F3. La estructura del subdominio F3 de la talina se asemeja a un dominio PTB (de *phosphotyrosine-binding*), que reconoce motivos NPxY situados en la zona más distal a la membrana de las colas de las cadenas β (Calderwood et al, 2002). Los motivos NPxY se

encuentran bien conservados en la mayoría de las colas β habiéndose observado que mutaciones que perturban este motivo inhiben la unión de talina e interfieren con la activación de la integrina (O'Toole et al, 1995). De forma similar, las mutaciones en el dominio PTB de talina previenen su unión a la cola β de la integrina bloqueando la activación de la misma (Tadokoro et al, 2003). Tomado en conjunto, todo hace concluir que la interacción cola β -talina representa un mecanismo general para la activación de las integrinas.

La unión de talina también afecta a las regiones próximas a la membrana de las colas $\beta 3$, y esto probablemente sea un requerimiento para la transmisión de la señal de activación (Ulmer et al, 2003; Vinogradova et al, 2002). Se ha sugerido un modelo de activación en dos pasos: el dominio de cabeza globular de la talina reconocería en primer lugar un sitio de unión de alta afinidad en la región de la cadena β más distal a la membrana, que proveería una fuerte unión entre la talina y la integrina β , permitiendo subsecuentemente la unión a un segundo sitio de menor afinidad y situado más proximalmente a la membrana que se encontraría implicado en la asociación de la cadena β con la cadena α . Esto desencadenaría la separación de las dos colas citoplasmáticas y la activación de la integrina (Wegener et al, 2007; García-Álvarez et al, 2003).

El control de esta interacción talina-integrina parece recaer de nuevo en la cabeza globular de la misma, ya que esta en solitario, sin el dominio en forma de varilla, tiene una afinidad seis veces más alta que la talina intacta por la cola $\beta 3$, sugiriendo que el sitio de unión estaría enmascarado en la proteína completa debido a una interacción intra o intermolecular (Critchley, 2005; Yan et al, 2001). En su conformación autoinhibida, la talina se localiza en el citoplasma de la célula, y sólo después de una estimulación con un agonista, se transloca a los complejos de integrinas (Bertagnolli et al, 1993). Por consiguiente, la cuestión de cómo la talina pasa a estar desbloqueada y estabilizada en su conformación abierta y de esta forma se vuelve competente para una interacción productiva con las integrinas es de central importancia. En proteínas de tipo ERM, las interacciones entre el dominio FERM y la porción C-terminal de la molécula enmascaran sitios de unión a ligando (Hamada et al, 2003; Pearson et al, 2000), y en este sentido, la proteasa calpaína provee un mecanismo *in vivo* para la separación de los dominios N- y C-terminal de la talina que desenmascararía el lugar de unión a la integrina, ya que el corte proteolítico producido por la esta proteasa incrementa la unión de la talina a las integrinas *in vitro* (Yan et al, 2001). Por otro lado, la unión del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI4,5P₂) a la talina induce en ésta un cambio conformacional que desenmascara su sitio de unión a la integrina en el dominio FERM y que aumenta su asociación con las colas de las integrinas $\beta 1$ (Martel et al, 2001), proporcionando un segundo mecanismo que permitiría la asociación integrina/talina. Además de todo esto, se ha comprobado que la fosforilación en tirosinas del motivo NPXY en la cola β de la integrina inhibe la unión de talina (Tapley et al, 1989), siendo esto consecuente con la observación de que la fosforilación de estos motivos por la tirosin-quinasas de la familia Src disminuye la adhesión celular (Datta et al, 2002) y lleva al desplazamiento de las integrinas de las adhesiones focales (Johansson et al, 1994). De hecho, las colas que contienen motivos no fosforilables NPxF retienen la capacidad de unión a talina y pueden ser activados por estímulos fisiológicos (Xi et

al, 2003), lo que indicaría que la fosforilación por las quinasas de la familia Src u otras quinasas podría ser un importante regulador negativo de la actividad de las integrinas. La familia de quinasas Src podría también fosforilar a la talina (Pasquale et al, 1986); sin embargo, a pesar de los numerosos artículos que informan sobre fosforilaciones en serina, treonina o tirosina de la talina (por ejemplo Beckerle, 1990; Turner et al, 1989), los efectos de estas modificaciones permanecen sin esclarecer.

Muchas vías de señalización celular son capaces de regular la activación de las integrinas, incluyendo entre ellas aquellas que implican a la familia Ras de las GTPasas (Kinbara et al, 2003). La incapacidad de algunas de estas GTPasas para activar a las integrinas en células deficientes en talina (Tadokoro et al, 2003) sugiere que la talina podría ser el último paso

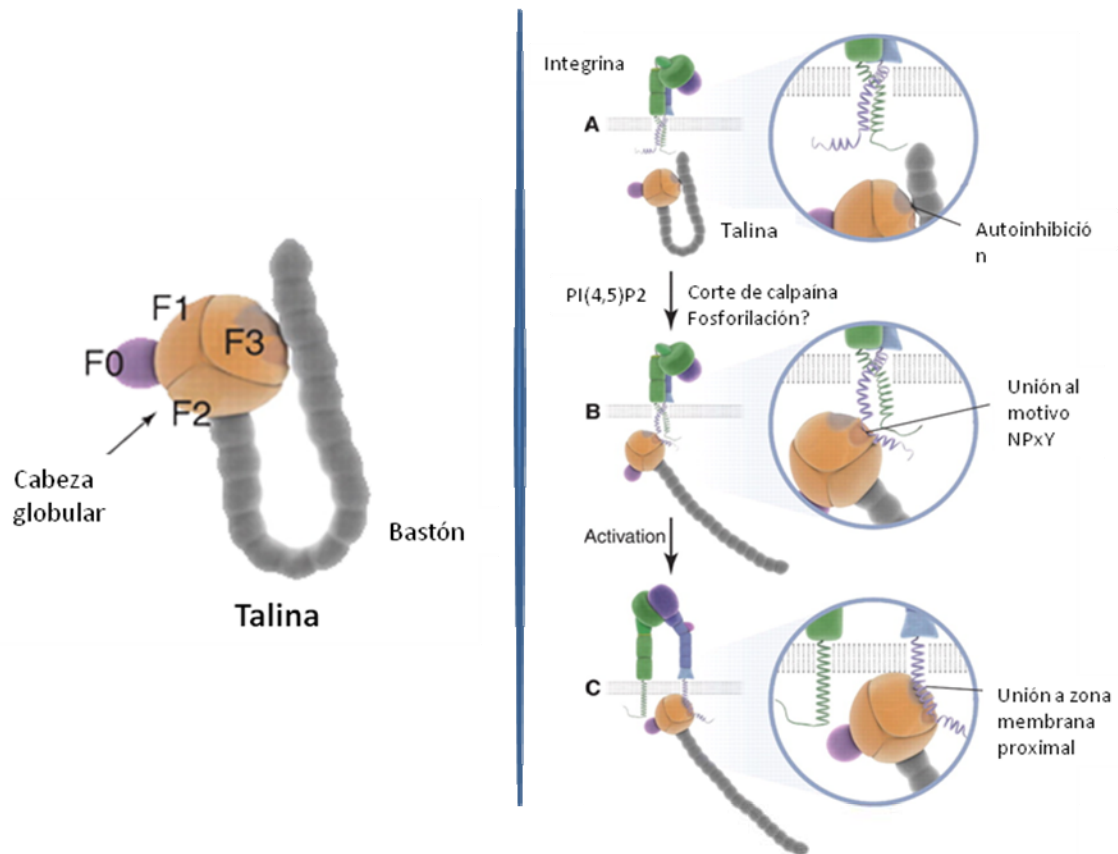


Figura 2.5: En la parte izquierda de la figura puede verse una representación esquemática de talina; para mayor sencillez se ha expuesto sólo el monómero de talina. El dominio FERM se representa por una esfera subdividida en tres subdominios, F1, F2 y F3. En la zona de la derecha aparece la activación de la integrina por talina. (A) La talina citoplasmática es activada por un mecanismo que desenmascara el sitio de unión en la cabeza globular deshaciendo la interacción autoinhibitoria con el dominio en forma de bastón, pudiendo este mecanismo consistir en un corte proteolítico por calpaína, la acción del PI(4,5)P₂ o, presumiblemente también, en una fosforilación. (B) El subdominio F3 de la talina se une al motivo NPxY situado más distalmente a la membrana en la cola citoplasmática de la cadena β de la integrina. (C) En un segundo paso de unión a la integrina, el subdominio F3 interacciona con el motivo NPxY más proximal respecto a la membrana en la cola citoplasmática de la cadena β, lo que produciría la separación de las cadenas y la consiguiente extensión y activación de la integrina (Adaptado de Moser et al, 2009)

situado entre estas vías y las colas citoplasmáticas de la integrina, estando pendientes de identificación, los efectores que conectarían estas rutas con la unión final de talina a las integrinas.

2.1.2. Otros reguladores de la activación de las integrinas: las kindlinas

Otras proteínas que contienen dominios similares a PTBs tienen capacidad de unirse a las colas β de las integrinas de un modo similar a la talina (Calderwood et al, 2003; García-Álvarez et al, 2003). Estas proteínas incluirían a Numb, Dok-1, ICAP-1 α (de *integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 α*) y a las Kindlinas (Calderwood, 2004; Calderwood et al, 2003), aunque la mayoría de estas proteínas o bien no producen activación de la integrina o bien son mucho menos activas en esta cuestión que la talina. Es más, algunas de ellas incluso podrían antagonizar la unión de la talina a las integrinas.

Entre ellas, las kindlinas han cobrado relevancia últimamente tras la comprobación de que ratones con la expresión suprimida de uno de los miembros de esta familia, la Kindlina-3, presentan una activación deficiente de las integrinas (Moser et al, 2008), y tras el descubrimiento de que mutaciones en el gen que codifica para esta proteína son la causa de la deficiencia de adhesión leucocitaria de tipo III (LAD III). En contraste con la LAD I, que afectaría únicamente a la expresión de integrinas de tipo $\beta 2$, la LAD III además de los defectos en adhesión leucocitaria, también muestra defectos hemostáticos ocasionados por la disfuncionalidad de plaquetas como resultado de la activación defectuosa de las integrinas $\beta 3$ (Kuijpers et al, 2009; Svensson et al, 2009; McDowall et al, 2003).

Las kindlinas conforman una familia de tres proteínas citoplasmáticas nomenclaturadas del 1 al 3 capaces de interaccionar de forma directa con secuencias de tipo NPxY en los dominios intracelulares de las integrinas, de forma similar a la talina. La Kindlina-3, que se expresa exclusivamente en células de origen hematopoyético, se recluta a las cadenas β de las integrinas, pero a una secuencia NxxY que se encuentra en una zona más distal a la membrana de la que se encuentra la secuencia NPxY a la que se une la talina.

2.2. Transmisión de los reajustes intracelulares al dominio extracelular

La unión de proteínas señalizadoras como talina o las kindlinas al dominio citoplasmático de la integrina induce, según hemos visto, la separación de las colas α y β de la integrina, iniciando una serie de reajustes conformacionales en los dominios citoplasmáticos que implican la transmisión de los cambios producidos, desde los mismos y a través de los dominios transmembrana y extracelulares próximos a la membrana, hasta el lugar de unión a ligando situado en la zona extracelular más distal. Muy poco se conoce sobre el papel de los dominios transmembrana en este proceso, pero los cambios conformacionales en los dominios

extracelulares próximos a la membrana sí han sido documentados, y el plegamiento/desplegamiento de dominios que conectan esta región con los dominios de unión a ligando podrían ser los que transmitieran la señal de activación (Beglova et al, 2002; Du et al, 1993). Como en el caso de las regiones intracelulares próximas a la membrana, la modificación de las regiones extracelulares próximas a la membrana que producen la inhibición de la separación de las subunidades de la integrina bloquean su activación, mientras que aquellas modificaciones que propician la separación promueven la activación (Xiong et al, 2003; Takagi et al, 2002; Takagi et al, 2001).

Varios modelos no mutuamente excluyentes se han propuesto para explicar la transmisión de la señal de activación (Li et al, 2003; Hynes, 2002; Liddington y Ginsberg, 2002; Takagi et al, 2002), consistiendo en movimientos en pistón, de bisagra, separación y torsión, e implicando siempre algún cambio en la orientación de las subunidades respecto una de otra y respecto a la membrana. Todos ellos podrían ser potencialmente regulados mediante la alteración de la asociación de las regiones transmembrana o de las secuencias flanqueantes próximas a la membrana. Sin embargo, a pesar de recientes apoyos experimentales obtenidos por el modelo de movimiento en pistón (Liddington y Ginsberg, 2002; Armulik et al, 1999) y del modelo de separación de las subunidades (Kim et al, 2003), en el momento actual no existen datos suficientes para distinguir claramente entre estos modelos de activación.

3. SEÑALIZACIÓN ‘OUTSIDE-IN’ A TRAVÉS DE LAS INTEGRINAS

Además de su papel en adhesión a ligandos de la matriz extracelular o a receptores en células adyacentes, las integrinas sirven como vínculos mecánicos transmembrana entre estos contactos extracelulares y el citoesqueleto de actina (con excepción de la integrina $\alpha 6 \beta 4$ que conecta con los filamentos intermedios) al que regula y modula. Las proteínas submembrana que realizan la conexión de los dominios citoplasmáticos con el citoesqueleto, entre las que destacan la vinculina, la paxilina y FAK, son múltiples y sus interacciones son complejas (van der Flier y Sonnenberg, 2001; Zamir y Geiger, 2001).

En parte relacionado con el ensamblaje de las uniones citoesqueléticas que realizan las integrinas, la unión de éstas a sus ligandos desencadena una gran variedad de eventos de transducción de señales que sirven para modular muchos aspectos del comportamiento celular incluyendo proliferación, supervivencia/apoptosis, forma, polaridad, motilidad, expresión génica y diferenciación. Este tipo de señalización de fuera hacia dentro de la célula es conocido por el nombre de señalización ‘outside-in’, y se consigue al unirse el dominio extracelular de la integrina a su ligando, tras lo cual se produce una agrupación o *clustering* con otras integrinas, resultando en la formación de complejos intracelulares altamente organizados que se conectan con el citoesqueleto. Estos complejos incorporan una gran

variedad de moléculas incluyendo a los propios dominios citoplasmáticos de las integrinas, proteínas citoesqueléticas y un amplio espectro de moléculas de señalización cuya alta concentración local facilita la producción de cascadas de señalización intracelulares hacia el interior a través de interacciones proteína-proteína, que se relacionan con el citoesqueleto así como con redes de señalización intracelular complejas (Qin et al, 2004; Giancotti y Ruoslahti, 1999).

Muchas vías estimuladas por la señalización 'outside-in' de las integrinas son muy similares a aquellas desencadenadas por receptores de factores de crecimiento y están íntimamente acopladas con ellas. De hecho, muchas respuestas celulares a factores de crecimiento solubles tales como EGF (de *Epidermal growth factor*, o factor de crecimiento epidérmico), PDGF (de *Platelet-derived growth factor*, o factor de crecimiento derivado de plaquetas), ácido lisofosfatídico (LPA) y trombina, son dependientes de que la célula sea adherente al sustrato a través de las integrinas. Esta es la esencia de la dependencia de anclaje en la supervivencia celular y la proliferación, y las integrinas subyacen en la base de estos fenómenos (Schwartz y Assoian, 2001; Assoian, 1997). En la actualidad está bien establecido que las señales mediadas por las integrinas son necesarias en células normales para bloquear la apoptosis vía la PI3 quinasa y Akt, y para estimular la progresión celular a través del ciclo vía ERK, ciclina D1 y otras

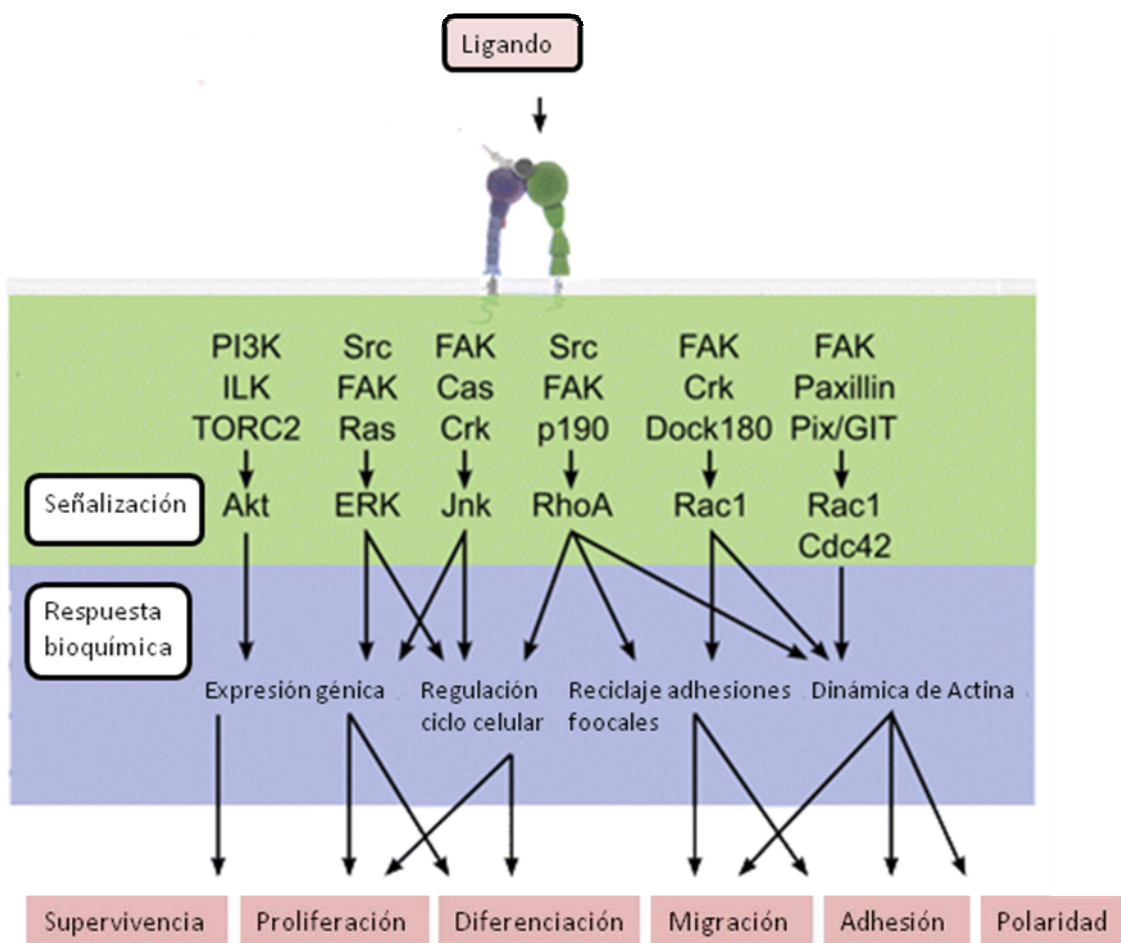


Figura 2.6: Señalización 'outside-in' y ejemplos de vías de transducción de señales situadas más abajo de la activación de la integrina (Adaptado de Legate et al, 2009)

proteínas.

En este momento, aunque muchos de los componentes intracelulares implicados en este tipo de señalización de las integrinas han sido ya identificados y a pesar de lo mucho que se ha aprendido sobre las variadas vías de transducción implicadas a partir de la señalización *outside-in*, aún faltaría definir una visión molecular de cómo los diversos eventos ocurren en tiempo y espacio (Giancotti y Ruoslahti, 1999).

4. LA SUBFAMILIA DE LAS INTEGRINAS LEUCOCITARIAS EN LAS FUNCIONES DEPENDIENTES DE ADHESIÓN

Las integrinas leucocitarias se encuentran presentes en un estado inactivo en leucocitos circulantes, sin embargo, tras la estimulación del leucocito con citoquinas, un agonista de un receptor acoplado a proteínas G o ligandos de alta valencia, sufren rápidos cambios conformacionales que conducen a su activación, requerida para una óptima funcionalidad de la misma. Es importante resaltar que las integrinas $\beta 2$ se encuentran inactivas en los leucocitos en reposo, para evitar la extravasación leucocitaria, y que pueden ser rápidamente activadas cuando es necesario, para permitir la función inmune. Defectos en ambas situaciones tienen consecuencias patológicas.

4.1. Adhesión al endotelio y trans migración

Las integrinas de tipo $\beta 2$ activas son las encargadas de mediar la adhesión leucocitaria y la trans migración a través del endotelio, a través de interacciones con miembros de la superfamilia de las integrinas como ICAM-1 en el endotelio activado. Durante esta extravasación, la actividad de las integrinas leucocitarias está predominantemente regulada por cambios conformacionales y *clustering*, siendo la estimulación de las integrinas del leucocito una respuesta rápida que ocurre en minutos, y que no requiere un aumento de la expresión de integrinas en superficie (Lo et al, 1989; Vedder y Harlan, 1988).

La activación de las integrinas leucocitarias a través de la señalización *inside-out*, principalmente mediada por quimioquinas, implica a varias rutas, incluyendo a pequeñas GTPasas (Wittchen et al, 2005), así como interacciones entre la cola citoplasmática de la integrina y proteínas de unión a actina, como talina (Wegener et al, 2007; Kim et al, 2003) y α -actinina (Sampath et al, 1998), así como proteínas 14-3-3 (Fagerholm et al, 2005), que inducen cambios conformacionales en la integrina (Wegener et al, 2007). Se ha demostrado que en el caso de LFA-1, es la pequeña GTPasa Rap1 la encargada de regular la afinidad de la integrina para estimular la adhesión (Kinashi, 2005; Katagiri et al, 2003; Shimonaka et al, 2003; Tohyama et al, 2003; Katagiri et al, 2000), siendo además imprescindibles en el proceso,

intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), como el CalDAG-GEF1 (Bergmeier et al, 2007) o el Vav1 que activan a Rap1 participando de este modo en la modulación de la afinidad de las integrinas leucocitarias. De hecho, la deficiencia en CalDAG-GEF ha sido asociada a un defecto en la adhesión del leucocito al endotelio vascular tanto en humanos como en ratones (Pasvolsky et al, 2007; Martinez Gakidis et al, 2004).

4.2. Fagocitosis

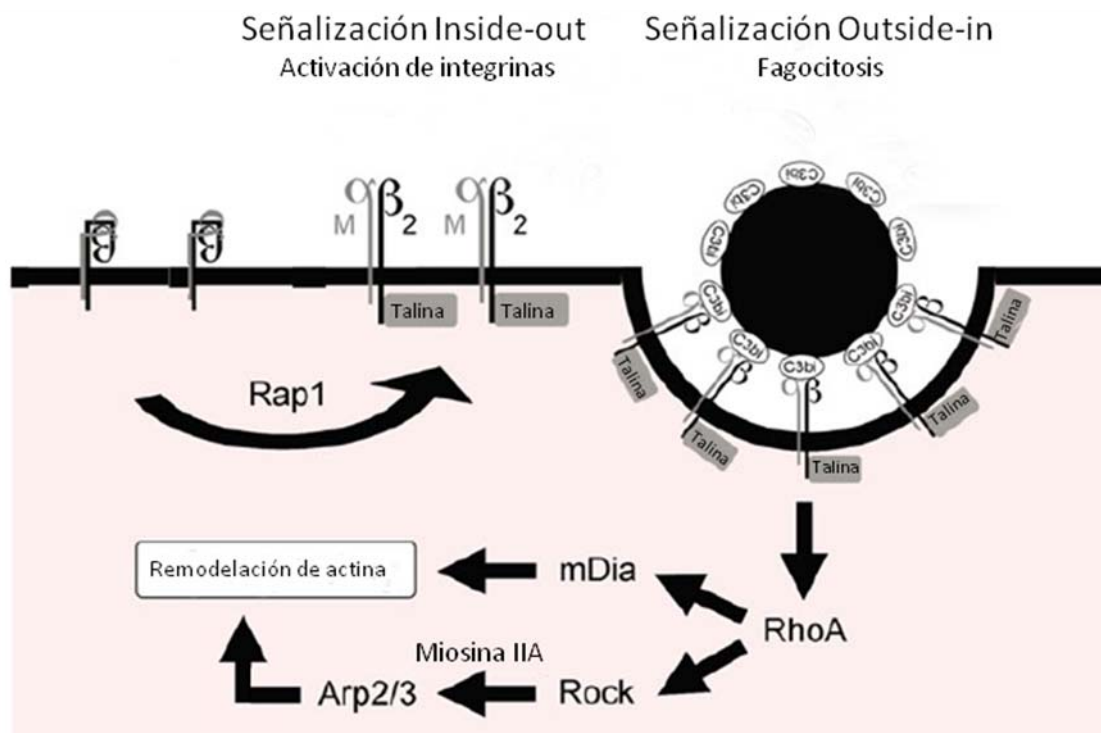
Las integrinas leucocitarias Mac-1 y CD11c/CD18 también promueven la fagocitosis de microbios opsonizados con el complemento para ser englobados en fagosomas y posteriormente ser destruidos (Dupuy y Caron, 2008). Ambas se expresan tanto en macrófagos como en neutrófilos y respecto a sus funciones fagocíticas son conocidas como CR3 y CR4, respectivamente (Brown, 1986), siendo hasta la fecha el CR3 o Mac-1, el más ampliamente estudiado.

Mac-1 es capaz de unirse a un amplio espectro de ligandos a través de diferentes sitios de reconocimiento (Diamond et al, 1993). En concreto, la unión del fragmento del complemento iC3b, para el cual constituye un receptor específico (Beller et al, 1982) lleva a la fagocitosis de la partícula a la que esta molécula se encuentra opsonizando, pero el receptor también puede mediar procesos independientes de la fagocitosis como extensión celular sobre superficies (*spreading*) y quimiotaxis a través de la interacción con las moléculas de adhesión intercelular ICAM-1 (CD54; Diamond et al 1990), ICAM-2 (CD102; Xie et al, 1995), ICAM-4 (LW; Bailly et al, 1995) y la glicoproteína de plaquetas Ib α (Simon et al, 2000), o moléculas de la matriz extracelular como fibrina y fibrinógeno (Altieri et al, 1988; Wright et al, 1988), colágeno (Walzog et al, 1995) o heparán sulfatos (Diamond et al, 1995). Además, Mac-1 también puede mediar fagocitosis no opsónica de partículas por unión a moléculas como el β -glucano (Thornton et al, 1996). La célula es capaz de distinguir todos estos ligandos para producir diferentes efectos, lo que sugiere que tanto el receptor como los elementos de señalización secundarios son afectados de forma diferente por diferentes ligandos.

La fagocitosis que se produce a través de Mac-1 requiere señales estimuladoras extracelulares como quimioquinas, citoquinas (por ejemplo TNF α) o productos bacterianos (por ejemplo, el LPS o el fMLP) (Aderem y Underhill, 1999). El potencial fagocítico de esta integrina también puede ser experimentalmente inducido por ésteres de forbol (Wright y Meyer, 1986). La necesidad de una activación celular previa a la fagocitosis mediada por este receptor, refleja su naturaleza de integrina, ya que Mac-1, se encuentra en un estado conformacional inactivo en leucocitos en reposo y es la acción de estos estímulos la que activa su capacidad fagocítica vía señales de tipo '*inside-out*'. El descubrimiento de que Rap1 es activado por los estímulos antes mencionados y que dicha activación en la célula es necesaria y suficiente para activar la unión de ligando de Mac-1 y estimular su capacidad fagocítica en macrófagos, ha provisto una base molecular para este proceso de señalización. Es más, la demostración de la existencia de un vínculo entre la actividad de Rap1 y la funcionalidad de la integrina α M β 2, desencadenada por

la unión de talina a la cola citoplasmática β_2 durante la fagocitosis, ha supuesto un avance muy importante en la comprensión de la señalización 'inside-out' de las integrinas en general (Caron et al, 2000).

Un avance significativo en el entendimiento de los la fagocitosis a través de los receptores de complemento fue el descubrimiento de que, al contrario de la que se produce a través del Fc γ R y la mayoría de otros receptores fagocíticos, ésta requiere la actividad de RhoA, pero no la de Rac1 o Cdc42 para conducir la polimerización de actina y la ingesta de la partícula (Caron y Hall, 1998). Estudios de microscopía electrónica temprana muestran que la fagocitosis mediada por Mac-1 no se asocia con la formación de protrusiones de membrana (Allen y Aderem, 1996), un evento que correlaciona con la activación de Rac1 y Cdc42. Por el contraste, siguiendo a la ligación de Mac-1, se produce una activación específica de RhoA, que es reclutada de esta forma a los lugares de fagocitosis (Wiedemann et al, 2006). De acuerdo con ello, la inhibición de RhoA usando tanto mutantes dominante negativos como la C3 transferasa, un inhibidor específico de Rho, inhibe la fagocitosis dependiente de Mac-1 tanto en líneas celulares de macrófagos como en fibroblastos transfectados con esta integrina (Wiedemann et al, 2006; Colucci-Guyon et al, 2005; Caron y Hall, 1998). La implicación de la



presencia de RhoA en la vía que conduce desde Mac-1 a la dinámica de actina se ve también

Figura 2.7: La integrina α M β 2 apenas une ligando en leucocitos en reposo, en cambio, estímulos externos inducen una vía de señalización 'inside-out' que activa a la pequeña GTPasa Rap1, lo que resulta en cambios conformacionales en la integrina y que aumentan su afinidad por el ligando. En el caso de la integrina α M β 2, este proceso estimularía la fagocitosis de partículas recubiertas por iC3b, lo que acabaría por generar fuerzas que empujan a estas partículas dentro de la célula, siguiendo una ruta 'outside-in' que acaba con la polimerización de la actina y es dependiente de RhoA (Adaptado de Dupuy y Caron, 2008)

resaltada por el hecho de que el proceso fagocítico requiere dos efectores específicos de RhoA, la quinasa en serinas y treoninas Rock y el factor elongador del filamento de actina relacionado con formina (mDia) en ambos modelos celulares (Colucci-Guyon et al, 2005; Olazabal et al, 2002). La actividad de Rock media el reclutamiento local de la proteína ramificadora de actina Arp2/3 y la activación de miosina IIA bajo las partículas unidas (Olazabal et al, 2002; May et al, 2000), mientras que mDia se requiere para la polimerización de actina y coopera con la vía Rock-Arp2/3 para empujar las partículas al interior de la célula (Colucci-Guyon et al, 2005). Finalmente, mutaciones en dos regiones distintas de la cola citoplasmática de la integrina $\beta 2$ y coincidentes con residuos implicados en el reclutamiento de talina, eliminan el reclutamiento de RhoA y la activación, así como la polimerización de actina y la fagocitosis, mostrando la importancia de la subunidad $\beta 2$ en la vía de señalización de la ingestión (Wiedemann et al, 2006).

4.3. Supervivencia y proliferación

Además de sus funciones en adhesión y fagocitosis, recientemente el repertorio de funciones que abarcan el conjunto de integrinas $\beta 2$ se ha extendido para incluir un papel en la modulación de la vida media de los neutrófilos (Whitlock et al, 2000). La unión de Mac-1 a sus ligandos fibrinógeno, ICAM-1, o al fragmento del complemento iC3b también afecta a la vida media del neutrófilo a través de la integración de señales pro y antiapoptóticas (Mayadas y Cullere, 2005) a través de señalización de tipo *'outside-in'*. El fibrinógeno o ICAM-1 inducen la fosforilación de Akt y ERK con la subsecuente supresión de la apoptosis del neutrófilo. En cambio, la fagocitosis de bacterias opsonizadas con iC3b dependiente de integrinas, desencadena una activación de las caspasas 8 y 3 dependiente de especies reactivas de oxígeno, que sobrepasa la señalización de supervivencia mediada por ERK, resultando en apoptosis (Mayadas y Cullere, 2005).

LA PEQUEÑA GTPasa RAP1

En la superficie de las células, se expresan diferentes receptores que permiten a la célula responder a señales promovidas por el entorno. La activación de estos receptores en las células, en respuesta a los distintos estímulos externos, conduce a una gran variedad de eventos bioquímicos intracelulares en los que las pequeñas GTPasas juegan un papel fundamental.

Estas proteínas ciclan entre dos conformaciones inducidas por la unión de GTP o GDP. Factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) inducen la disociación de GDP para permitir la asociación de un más abundante GTP, que seguidamente puede ser hidrolizado a GDP por la actividad intrínseca GTPasa de estas proteínas en combinación con proteínas estimuladoras de dicha actividad denominadas GAPs (de *GTPase-activating proteins*). De esta forma, activadas en respuesta a señales, las pequeñas GTPasas actúan como interruptores moleculares, que se “encienden” cuando están unidas a GTP y se “apagan” cuando completan la transmisión de la señal, y que, en su conformación activa unida a GTP, interaccionan con efectores específicos, proteínas señalizadoras o estructurales, que son en último caso responsables de mediar sus efectos celulares.

Rap1 (Krev-1/smg 21) es una pequeña GTPasa de bajo peso molecular que pertenece a la subfamilia Ras de GTPasas, las cuales comparten aproximadamente un 50% de identidad en su secuencia de aminoácidos, particularmente en su región efectora, con la oncoproteína p21Ras,

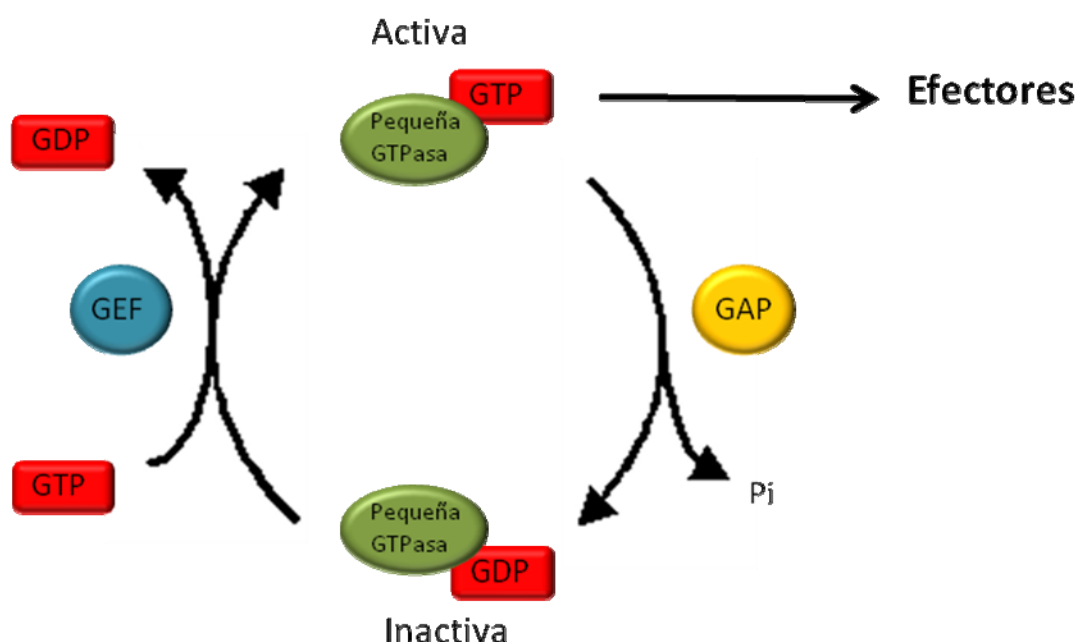


Figura 3.1: Ciclo de activación de las pequeñas GTPasas

que da nombre al grupo. Esta familia está considerada como la responsable de controlar el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia, y consiste en 19 miembros, de los cuales los mejor caracterizados han sido divididos en los grupos de Ras clásico (H-Ras, K-Ras y N-Ras), R-Ras, Ral y Rap.

El subgrupo Rap en humanos está constituido por dos pares de proteínas casi idénticas, Rap1A y Rap1B, y Rap2A y Rap2B (Farrell et al, 1990; Ohmstede et al, 1990; Pizon et al, 1988a; Pizon et al, 1988b), que difieren sólo en unos pocos residuos, teniendo un 95% y un 90% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos, respectivamente. Por contraste, las proteínas Rap1 y Rap2 son sólo un 60% idénticas una respecto a la otra, mostrando notables variaciones en su C-terminal (Takai et al, 2001; Reuther y Der, 2000). Esto puede tener cierto impacto en su localización subcelular y también explicar sus diferentes sensibilidades a RapGEFs o sus perfiles distintos en cuanto a dianas celulares (Janoueix-Lerosey et al, 1998; van den Berghe et al, 1997).

Rap1 fue originalmente identificada como un supresor de la transformación ejercida por K-ras en células NIH3T3 (Kitayama et al, 1989), y, consecuentemente, un gran número de estudios se han focalizado en el potencial de esta proteína para actuar antagónicamente con Ras. Se ha sugerido que Rap1 podría realizar esta labor antagónica por competición por la unión a proteínas efectoras comunes con Ras, como Raf-1 o las RasGAPs (Cook et al, 1993; Frech et al, 1990), sin embargo, también hay datos que sugieren que Rap1 puede actuar de una forma similar a Ras y activar proteínas señalizadoras situadas más abajo, como la proteína quinasa B-Raf (Ohtsuka et al, 1996). No está claro aún si Rap1 actúa en una vía de señalización paralela a Ras o independiente de la misma, o si la habilidad de Rap1 para antagonizar o complementar la transformación inducida por Ras es un efecto indirecto de su función, aunque datos recientes de tipo bioquímico, celular y de desarrollo revelan sin ambigüedad posible que Rap1 tiene al menos una función independiente de Ras en una gran variedad de sistemas celulares: el control de eventos relacionados con la adhesión (Caron, 2003).

Además de su capacidad para modular la transformación inducida por Ras y regular la adhesión celular, se han propuesto otros papeles potenciales para Rap1 como los derivados de su asociación con el citocromo B558 de forma dependiente de fosforilación (Bokoch et al, 1991) que supone que Rap1 podría modular el estallido oxidativo de las células fagocíticas (Maly et al, 1994). Por otro lado, el homólogo de Rap1 en levaduras (RSR/BUD1) es requerido para la localización de las yemas durante la división celular, indicando una probable participación de Rap1 en la regulación de los reordenamientos del citoesqueleto de actina (Chant y Herskowitz, 1991; Bender y Pringle, 1989). También se ha observado que Rap1 es sustrato de la proteína quinasa A (PKA) (Hoshijima et al, 1988), y datos *in vitro* apuntan que Rap1 puede aumentar la actividad de la proteína quinasa C (PKC), indicando que Rap1 podría jugar un papel en una vía de señalización intracelular que conduzca a la activación de esta quinasa (Labadia et al, 1993). Finalmente, a todas estas posibles funciones tan diversas, se suma la demostración de que Rap1A y Rap1B se asocian con los compartimentos endocíticos y

fagocíticos en células de mamífero, mientras que Rap2A se asocia con el Golgi (Pizon et al, 1994), sugiriéndose que Rap1 podría regular la endocitosis y/o la fagocitosis.

1. ACTIVACIÓN DE RAP1

La primera evidencia de que Rap1 podría estar implicado en procesos de transducción de señales vino de la observación de que el AMP cíclico (AMPc) induce un incremento en la forma unida a GTP de Rap1 (Altschuler et al, 1995). Subsecuentemente, en varios tipos celulares, se han encontrado varios estímulos que inducen la activación de Rap1, por ejemplo, en plaquetas por trombina y tromboxano A2 (Franke et al, 1997), en linfocitos mediante la activación del receptor de células T y la activación del receptor para antígenos de células B (Reedquist y Bos, 1998; McLeod et al, 1998; Boussiotis et al, 1997), en neutrófilos por fMLP y el factor de activación de plaquetas (M'Rabet et al, 1998) y en fibroblastos mediante, entre otros, EGF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), endotelina y LPA, pero no, por ejemplo, mediante insulina (Zwartkruis et al, 1998). En la mayoría de los casos, la activación es muy rápida, en segundos en plaquetas y en minutos en fibroblastos, sugiriendo que la activación de Rap1 es un evento que sucede en proximidad al receptor. En plaquetas y fibroblastos, la inhibición de la fosfolipasa C (PLC), por inhibidores farmacológicos impide la activación de Rap1 medida para todas las señales testadas, excepto para el AMPc. También se reduce de gran manera la activación de Rap1 a través del receptor de antígenos de células B deficientes para PLCγ (McLeod et al, 1998), indicando que la PLC media la activación de Rap1. De forma interesante, los dos segundos mensajeros generados por la activación de PLC, el Ca^{2+} y el diacilglicerol, son capaces de inducir la activación de Rap1, pero de una forma dependiente del contexto celular. En plaquetas, la activación inducida por Rap1 está mediada casi exclusivamente por Ca^{2+} (Franke et al, 1997), mientras que en células B es el diacilglicerol el que media la activación inducida por el receptor de antígenos (McLeod et al, 1998). En fibroblastos, tanto el Ca^{2+} como el diacilglicerol son capaces de inducir la activación de Rap1 (Zwartkruis et al, 1998).

De esta manera, al menos tres vías derivadas de tres distintos segundos mensajeros, el Ca^{2+} , el diacilglicerol y el AMPc, y algunas otras derivadas de la fosforilación en tirosinas que ocurre tras la activación de los receptores de tipo tirosin quinasa o asociados a una actividad tirosin quinasa (por ejemplo, el del EGF o el TCR), o de algunos receptores de citoquinas (por ejemplo, el de la Interleuquina 3) (M'Rabet et al, 1998), son capaces de inducir la activación de Rap1. Claramente, la activación de Rap1 es un evento sorprendentemente común, lo que apoya una función central en procesos de transducción de señales.

1.1. Regulación de la activación de Rap1

El cómo estas vías inducen la activación de Rap1 implica la definición de una ruta de activación en la que estos segundos mensajeros y las fosforilaciones derivadas de la activación de un receptor podrían activar directamente a GEFs específicas de Rap1, en analogía con las RasGEFs de Ras (Ebinu et al, 1998; Fam et al, 1997; Farnsworth et al, 1995). Las diversas GEFs que se han identificado, parecen permitir la activación localizada de Rap1 mediante la carga de GTP en localizaciones particulares en la célula, lo que resulta en un eficiente acoplamiento con efectores específicos para funciones particulares.

La primera GEF de Rap1 que fue identificada es C3G (*Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide releasing factor*), una proteína que contiene un dominio rico en prolina que interacciona con el dominio SH3 de miembros de la familia de proteínas adaptadoras Crk, Crk I, Crk II y CrkL (Kiyokawa et al, 1997; Gotoh et al, 1995). En general, esta asociación es constitutiva, pero la fosforilación en tirosinas del Crk puede romper la interacción (Okada et al, 1998). El dominio SH2 de Crk se une directamente a varias tirosin quinasas activadas por receptores y a proteínas adaptadoras que contienen fosfotirosinas (Kiyokawa et al, 1997), aumentando esta asociación la actividad GEF de C3G cuando está acompañado con Crk (Ichiba et al, 1997), por lo que en analogía con la RasGEF SOS, es plausible asumir que la formación de los complejos y la disociación de C3G regula la activación de Rap1 a través de tirosin quinasas. La C3G también es capaz de activar a R-ras (Gotoh et al, 1997), por lo que algunos de los efectos biológicos inducidos por la asociación Crk-C3G podrían estar mediados por esta GTPasa en lugar de por Rap1 (Mochizuki et al, 2000).

Un segundo factor de intercambio de nucleótidos asociado a la actividad de Rap1 serían los miembros de la familia CalDAG-GEF. Esta familia posee motivos de unión potenciales para el Ca^{2+} (*EF-hands*) y el diacilglicerol, por lo que podría estar regulada por una o por ambas moléculas, siendo muy posible que sean los principales mediadores de la actividad de Rap1 inducida por PLC. Sus integrantes tienen distintas especificidades: CalDAG-GEF I es capaz de activar a Rap1 y a R-Ras, siendo su expresión alta en cerebro y sistema hematopoyético (Kawasaki et al, 1998a); CalDAG-GEF II o RasGRP activaría a Ras y a R-Ras (Ebinu et al, 1998); y CalDAG-GEF III activaría a Ras, Rap1, Rap2 y R-Ras (Yamashita et al, 2000). Tanto CalDAG-GEF II como el III se translocan a las membranas al añadir el mimetizador del diacilglicerol TPA (12-tetradecanoil 13 acetato de forbol), pero son insensibles a niveles altos de Ca^{2+} . En contraste, el CalDAG-GEF I no se transloca en respuesta al TPA, pero es regulado alostéricamente por Ca^{2+} *in vitro* (Bos et al, 2001). Esto podría indicar que el CalDAG-GEF I es el principal mediador de la activación de Rap1 por Ca^{2+} , mientras que la activación de Rap1 por el diacilglicerol se produce a través del CalDAG-GEF III.

La activación de Rap1 derivada de un incremento en el AMPc intracelular viene mediada por una GEF específica de Rap1 denominada Epac1 (de *Exchange protein activated by cAMP*) (de Rooij et al, 1998). Además de un dominio catalítico, esta GEF contiene un dominio de unión a AMPc que es casi idéntico a los lugares de unión a esta molécula situados en la PKA. La unión

de AMPc activa a Epac1 *in vitro* e *in vivo*, lo que indicaría que esta proteína es una diana directa; es más, si se quita este dominio de unión de Epac1 el resultado es una GEF constitutivamente activa, mostrando que el dominio de unión a AMPc sirve como un dominio inhibitorio, que se inactiva por la unión de ligando. Esto sería muy parecido al mecanismo que sigue la activación de la PKA, aunque aquí los dominios de unión y catalíticos están presentes en diferentes subunidades que se disocian después de la unión del AMPc. Epac1 se expresa de forma ubicua, poseyendo un dominio DEP (de *Dishevelled/EGL-10/Pleckstrin*) responsable de su localización en la membrana. Un pariente cercano de esta GEF sería Epac2 o AMPc-GEF II, expresado predominantemente en cerebro, que contiene un lugar de unión a AMPc adicional, de menor afinidad, en la zona N-terminal (Kawasaki et al, 1998b).

Finalmente, una nueva GEF de Rap1 con un dominio PDZ, sería PDZ-GEF (de Rooij et al, 1999). Los dominios PDZ están implicados en interacciones proteína-proteína, en particular con las colas C-terminales de proteínas de membrana. El mecanismo de activación de esta GEF aún no está claro, aunque se sabe que también contiene un dominio autoinhibitorio que se relaciona con el dominio de unión a AMPc de Epac1, pero de muy baja afinidad.

Además de las GEFs, varias GAPs específicas de Rap1 juegan un papel en el control de la actividad de Rap1 (Noda, 1993a). Estas GAP pueden funcionar de forma diferente a las GAPs de Ras, ya que entre las características distintivas de Rap1 se encuentra el poseer una treonina en la posición 61, mientras que en Ras y la mayoría de las otras GTPasas de la misma familia este residuo es una glutamina. Como consecuencia, la actividad intrínseca GTPasa de Rap1 es diez veces menor que la de Ras, y de hecho, la sustitución de la glutamina por una treonina en Ras resulta en una actividad intrínseca fuertemente reducida (Noda, 1993b). Se han identificado y clonado varias de estas GAPs: Rap1GAP (Rubinfeld et al, 1991), tuberina (Wienecke et al, 1995), Spa-1 (Kurachi et al, 1997) y GAP^{IP4BP} (Cullen et al, 1995), siendo esta

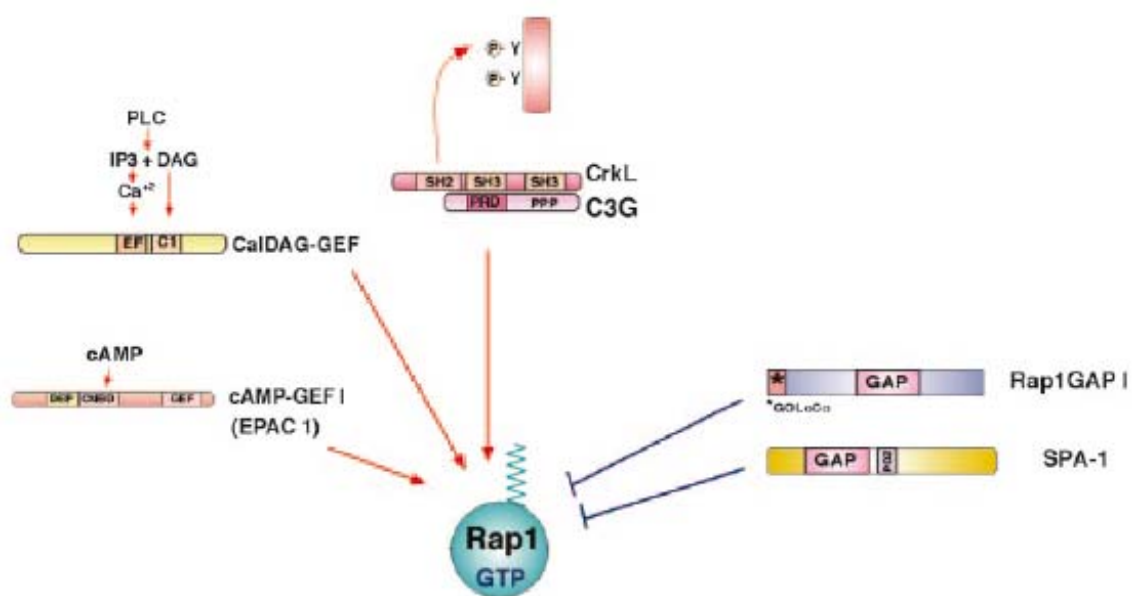


Figura 3.2: Regulación de la activación de Rap1 por las GEFs y GAPs mejor conocidas (Adaptación de Stork y Dillon, 2005)

última especial por ser capaz de actuar tanto en Ras como en Rap1 ([Bottomley et al, 1998](#)). Además, muy probablemente la proteína E6TP1 corresponde a una Rap1GAP ([Gao et al, 1999](#)). La tuberina y la GAP^{IP4BP} se expresan ubicuamente, Spa1 también se expresa de forma amplia, pero tiene unos niveles muy altos en el sistema hematopoyético. Rap1GAP está presente en la mayoría de los tejidos fetales, pero se encuentra restringida al cerebro durante la vida adulta. Considerando el muy bajo nivel de la actividad intrínseca GTPasa de Rap1, estas GAPs podrían servir como reguladores muy importantes de la actividad de Rap1.

2. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE RAP1

Rap1 se expresa de forma ubicua pero es particularmente abundante en plaquetas, neutrófilos y cerebro. Mientras que Ras se encuentra de forma mayoritaria localizado en la membrana plasmática, la localización de Rap1 parece ser más variable y depende del tipo celular.

En plaquetas, Rap1 se localiza de forma principal en la membrana plasmática o en las membranas del sistema abierto canalicular ([Torti y Lapetina, 1992](#)), y de forma secundaria en las membranas de los α -gránulos ([Berger et al, 1994](#)). De forma interesante, en plaquetas, Rap1 es uno de los principales sustratos de la proteína quinasa A (PKA) ([Bos et al, 1997](#)). En otras células, la activación de la PKA resulta en la fosforilación de una serina adyacente o cercana al motivo C¹⁸¹AAX C-terminal (la serina 180 de Rap1A y la serina 179 de Rap1B) ([Altschuler y Lapetina, 1993](#)), cuya función aún es desconocida. El lugar de fosforilación sugiere que puede afectar al procesamiento y/o la localización en la membrana de Rap1, pero otras funciones no pueden ser excluidas. En neutrófilos, Rap1 también se localiza en la membrana plasmática y en gránulos específicos ([Maridonneau-Parini y de Gunzburg, 1992](#); [Quinn et al, 1992](#)), mientras que en linfocitos la mayor parte de Rap1 se localiza en vesículas intracelulares desde las que se moviliza por exocitosis hasta la membrana plasmática ([Mor et al, 2009](#)). Es remarcable hacer notar, que en todos estos tipos celulares, Rap1 se transloca desde los gránulos o vesículas hasta la membrana plasmática tras la estimulación, lo que podría indicar que la función de Rap1 se produce a partir de dicha translocación.

La localización intracelular de Rap1 podría explicar porque esta proteína es regulada predominantemente por segundos mensajeros y no por la asociación directa de una GEF a un receptor como se había mostrado para SOS. De hecho, Epac se localiza perinuclearmente, mientras que la GEF C3G parece activar a Rap1 en la membrana plasmática por interacción con las Crk ([Zwartkruis y Bos, 1999](#)). También las GAPs específicas de Rap1 parecen estar situadas en lugares específicos en la célula. GAP^{IP4BP} solamente se encuentra en la membrana plasmática, debido a su unión a través de un dominio PH/BTK al inositol 1, 3, 4, 5 tetrakisfosfato ([Lockyer et al, 1997](#)). La tuberina está presente en el Golgi ([Wienecke et al, 1996](#)) y Spa-1 ha sido hallado en el citoesqueleto cortical ([Tsukamoto et al, 1999](#)). Una isoforma de Rap1GAP, Rap1GAP II, ha sido clonada e implicada en la disminución en la

actividad de Rap1 mediada por receptores de tipo serpentina (Mochizuki et al, 1999), pudiendo unirse directamente a las subunidades $G\alpha$ activadas de las proteínas G heterotriméricas en la membrana y siendo activada a consecuencia de ello.

De este modo, aparentemente hay una gran variedad de lugares donde Rap1 o las proteínas reguladoras de Rap1 son localizadas. Esto abre la posibilidad de que la activación de Rap1 y la subsecuente respuesta estén determinadas por el entorno local, lo que podría explicar porqué Ras y Rap1 inducen diferentes respuestas aunque sus dominios efectores sean tan similares.

3. IMPLICACIÓN DE RAP1 EN FUNCIONES BIOLÓGICAS

Rap1 cumple una función esencial en eucariotas, como prueba la letalidad embrionaria de la expresión de alelos pérdida de función RAP1 en *Drosophila* (Hariharan et al, 1991), y de ratones con la doble supresión de la expresión de Rap1A y Rap1B (Wittchen et al, 2011), así como de ratones carentes de C3G (Ohba et al, 2001). Este papel crucial se refleja a nivel celular, ya que líneas celulares de mamífero o de *Dictyostelium discoideum* deficientes para Rap1 son imposibles de establecer (Jeon et al, 2007; Caron, 2003; Ribeiro-Neto et al, 2002).

Existen ratones con la expresión suprimida específicamente para cada isoforma de Rap1. Los ratones Rap1A^{-/-} se desarrollan de forma normal, sin grandes alteraciones macroscópicas, pero sin embargo, exhiben defectos de adhesión *in vitro* en sus células T y B, aunque esto no se traduzca en defectos hematopoyéticos o de asentamiento celular en órganos linfoides *in vivo*, y defectos en la adhesión de macrófagos, haptotaxis y fagocitosis, además de una respuesta disminuida de los neutrófilos en cuanto a producción de superóxido tras estimulación con péptidos formilados y ésteres de forbol (Li et al, 2007). En contraste, los ratones Rap1B^{-/-} tienen un fenotipo más severo, exhibiendo más de un 85% de letalidad en la etapa final embrionaria o en la perinatal debido a complicaciones derivadas de hemorragias embrionarias, siendo los animales supervivientes más pequeños y mostrando defectos en cuanto a sangrado debido a una disminución de la adhesión mediada por integrinas y a una reducción en la agregación plaquetaria (Chrzanowska-Wodnicka et al, 2005).

En total acuerdo con esta situación, la mayoría de las funciones propuestas para Rap1 están relacionadas con la adhesión celular. Sin embargo, también hay algunas funciones de Rap1 que parecen no tener que ver con este proceso. El si estas funciones son dependientes de alguna forma de adhesión o consecuencia de algún papel central elusivo en el que todas las funciones de Rap1 confluyen aún es una cuestión no resuelta.

3.1. Implicación de Rap1 en la adhesión celular

La evidencia que implica a Rap1 en el control de la adhesión celular es harto convincente y se extiende desde organismos como *Dicyostelium discoideum* hasta células de mamíferos. Rap1 fue caracterizado por primera vez como el producto de un cDNA que inducía la adquisición de una morfología aplanada, no transformante y fuertemente adherente (Kitayama et al, 1989), y en la actualidad, está bien establecido que la interferencia con la activación de Rap1 tiene efectos profundos en un amplio rango de procesos adhesivos tales como morfogénesis, fagocitosis, adhesión célula-célula, migración y extensión celular.

Varias Rap1GEFs como C3G y miembros de las subfamilias Epac, CalDAG-GEF y PDZ-GEF se han relacionado con la regulación de complejos de adhesión (Kooistra et al, 2007; Bos, 2005). Mientras que la sobreexpresión de estas RapGEFs o de las formas activas de Rap1 induce una marcada extensión celular en células HEK293T, bajos niveles de Rap1 activa, conseguidas a través de la sobreexpresión tanto de RapGAPs como del mutante dominante negativo Rap1N17, producen un redondeamiento en las células (Tsukamoto et al, 1999). De forma similar, el mutante constitutivamente activo Rap1V12 induce la extensión celular de células de *Dictyostelium* (Rebstein et al, 1997) y la extensión dependiente de integrinas de una gran variedad de células hematopoyéticas. Como era de esperar, Rap1 muestra efectos opuestos en cuanto a extensión y motilidad celular, y en fibroblastos embrionarios de ratón derivados de animales deficientes en C3G se observa un retraso en la extensión celular y una migración aumentada, siendo ambos efectos suprimidos mediante la sobreexpresión de Rap1 activo (Ohba et al, 2001).

La profunda influencia de la señalización de Rap1 en la morfología celular se hace también evidente *in vivo*: las mutaciones en Rap1 perturban la forma normal y la morfogénesis en el ojo, ovario y ala de los embriones de *Drosophila melanogaster* (Knox y Brown, 2002; Asha et al, 1999; Hariharan et al, 1991), sugiriendo datos recientes que Rap1 regula la posición de los marcadores de uniones adherentes (DE-cadherina, ZO-1 y canoe/AF-6, una diana efectora de Rap1) en la cara apical del epitelio que delimita el ala (Boettner y van Aelst, 2007). De forma interesante, Rap1 se recluta preferentemente a la unión entre dos células hijas tras la citocinesis, lo que es reminiscente a la situación en *Saccharomyces cerevisiae*, donde el factor de intercambio de Rap1 Bud5p se enriquece en el lugar de división de la célula (Kang et al, 2001). Esto tiene su reflejo también en células de mamífero, por ejemplo en experimentos realizados con la línea celular epitelial MDCK: en estas células, la expresión de un mutante dominante negativo de Rap1 impide que las células realicen uniones adherentes a través de la E-cadherina, mientras que la ruptura de contactos célula-célula ocasionada por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, de *hepatocyte growth factor*) puede ser completamente inhibida por la acción del Rap1 endógeno, lo que indicaría que vías de señalización en las que participa Rap1 están directamente implicadas en la formación y en la regulación dinámica de las uniones adherentes entre células (Price et al, 2004).

Finalmente, Rap1 controla varios tipos especializados de adhesión en células inmunes, como las sinapsis inmunológicas que forman la interfaz entre las células T y las células presentadoras de antígeno (Katagiri et al, 2002) y la fagocitosis dependiente de integrinas en macrófagos

(Caron et al, 2000). Es importante resaltar dos hechos adicionales en cuanto a Rap1 y la fagocitosis: primero, Rap1 también regula la fagocitosis de bacterias y bolitas de latex en *Dictyostelium discoideum* (Seastone et al, 1999); y segundo, en células de mamífero, Rap1 se encuentra asociado con fagosomas maduros (Garin et al, 2001; Pizon et al, 1994).

3.1.1. Rap1 controla la señalización 'inside-out' que activa a las integrinas

Dados los efectos que tiene sobre la extensión celular y la motilidad, se ha postulado desde hace mucho tiempo que Rap1 está implicado en la función de las integrinas. Los leucocitos han representado un buen modelo de estudio, en el que el efecto positivo de Rap1 unido a GTP en la adhesión mediada por integrinas es fácilmente observable, en contraste con los sistemas celulares adherentes más tradicionales (fibroblastos y células epiteliales), ya que las integrinas leucocitarias normalmente se encuentran en estado inactivo, y tras la señalización 'inside-out' provocada por agonistas, pasan a un estado conformacional activo que permite su unión a ligando y el desencadenamiento de la señalización 'outside-in' (Harris et al, 2000; Schoenwaelder y Burridge, 1999). Pero la regulación de la adhesión celular por Rap1 probablemente no se limite sólo a células leucocitarias, ya que existen pruebas tales como que la sobreexpresión de Spa-1 es capaz de bloquear el anclaje de células HeLa a placas recubiertas con fibronectina (Tsukamoto et al, 1999), y que un C3G dominante negativo bloquea al factor de crecimiento de hepatocitos en su activación de Rap1 afectando al reanclaje de células HEK293 a placas de cultivo (Sakkab et al, 2000).

Muchas citoquinas y factores de crecimiento promueven la adhesión celular dependiente de integrinas a través de la activación de Rap1 (Kinbara et al, 2003). Rap1 regula a las integrinas que están relacionadas con el citoesqueleto de actina, como las integrinas de las subfamilias $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ (Bos, 2005), habiéndose comprobado su implicación en la activación funcional de varios heterodímeros como $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5), $\alpha L\beta 2$ (LFA-1), $\alpha M\beta 2$ (CR3) y $\alpha IIb\beta 3$ (Bertoni et al, 2002; Sebzda et al, 2002; Arai et al, 2001; Caron et al, 2000; Katagiri et al, 2000; Reedquist et al, 2000). Rap1A activo es suficiente para inducir la función asociada a integrinas en líneas celulares de células T y macrófagos (Schmidt et al, 2001; Caron et al, 2000; Katagiri et al, 2000; Reedquist et al, 2000), así como en células T primarias y megacariocitos (Bertoni et al, 2002; Sebzda et al, 2002) incluso en ausencia de agonistas extracelulares. De forma convergente, la expresión de Rap1GAP o Rap1N17 elimina la capacidad de las integrinas para unirse a sus ligandos, incluso en células estimuladas con agonistas. En los varios modelos utilizados, todos los agonistas que provocan señalización 'inside-out' aumentan los niveles de Rap1 endógeno unido a GTP en ausencia de ligandos de integrinas, mientras que ninguno de los efectos de Rap1 es atribuible a cambios medibles en la expresión de integrinas. La mayoría de los estudios usaron mecanismos que excluían el impacto de Rap1 en su señalización 'outside-in', es decir, tras la unión de las integrinas a sus ligandos: para ello utilizaban la unión de un ligando soluble (Bertoni et al, 2002; Sebzda et al, 2002; Katagiri et al, 2000), una diana pequeña fagocítica (Caron et al, 2000) o un anticuerpo específico de conformación (Bertoni et

al, 2002; Katagiri et al, 2000; Reedquist et al, 2000), antes que la mera adhesión al sustrato, que potencialmente se puede derivar tanto de señalización `inside-out` como `outside-in`.

Tomados en conjunto, estos datos establecen un papel general para Rap1 en el control de la señalización `inside-out` hacia las integrinas, aunque el exacto significado de la activación funcional, esto es, si la señalización `inside-out` induce cambios en la afinidad, en la avidéz o en ambas, de las integrinas, aún es un hecho controvertido (Bos, 2005; van Kooyk y Figdor, 2000; Hughes y Pfaff, 1998). Una posible conexión entre Rap1 y la adhesión celular mediada por integrinas ha sido observada en plaquetas. En estas células Rap1 es expresada de forma abundante y se ve rápidamente activada tras la estimulación (Franke et al, 1997), sin embargo, la subsecuente inactivación de Rap1 depende de la adhesión celular mediada por integrinas y la agregación. Esto puede sugerir que Rap1 controla el comienzo de la adhesión, y que este proceso induce su inhibición (Franke et al, 2000).

Además de su papel en la señalización `inside-out`, hay datos que apuntan a un posible papel de Rap1 en la señalización `outside-in` derivada de las integrinas, aunque esto aún es algo controvertido. En plaquetas, la activación de su principal integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ parece inducir la activación de Rap1. Sin embargo, en estas células, la adhesión mediada por integrinas también es requerida para la subsecuente inactivación de Rap1 (Franke et al, 2000). Por otro lado, experimentos de adhesión con estímulos de tipo `outside-in` como son el Mn^{2+} o anticuerpos activadores en los que se usa la sobreexpresión de GAPs específicas de Rap1 para interferir con los niveles endógenos de Rap1 activa, muestran que este tipo de señalización también requiere cierto grado de activación de Rap1 que actuaría o bien influyendo en el cambio conformacional de las integrinas o en el *clustering* tras su activación, no siendo ambas posibilidades excluyentes entre sí (de Bruyn et al, 2002).

3.1.2. Talina en el mecanismo molecular de activación de las integrinas mediado por Rap1

El mecanismo molecular que subyace al efecto espectacular de Rap1 sobre la activación de las integrinas recae principalmente en la talina, una proteína que, como ya se ha descrito aquí antes, es esencial para la activación de las mismas, constituyendo además uno de los numerosos vínculos de las integrinas con el citoesqueleto. De hecho, Rap1 parece ser capaz de activar una gran variedad de integrinas en muchos tipos celulares, con excepción de la integrina $\alpha 6\beta 4$, que no está acoplada al citoesqueleto de actina (Enserink et al, 2004).

Se ha mostrado que Rap1 se activa en plaquetas en respuesta a estimulación con trombina (Franke et al, 1997), y, de hecho, la expresión reconstituyente de Rap1GAP en células CHO que expresan de forma estable dímeros de integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ inhibe la activación de estas integrinas en respuesta a PMA, un activador de la PKC. Convergentemente, Rap1 constitutivamente activo puede llevar a cabo la activación de las integrinas de forma independiente de PKC α en ausencia de PMA. En este proceso, Rap1 depende estrictamente de talina, ya que la activación de las integrinas inducida por Rap1 se bloquea al usar un mutante de talina deficiente para su unión a las integrinas y puede ser eludida usando un fragmento de talina “activado” derivado de su cabeza globular (Watanabe et al, 2008).

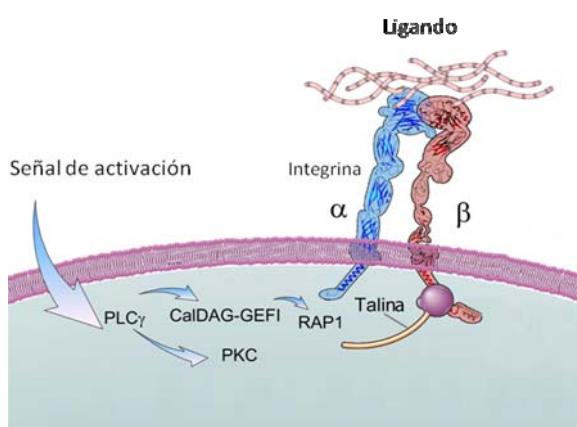


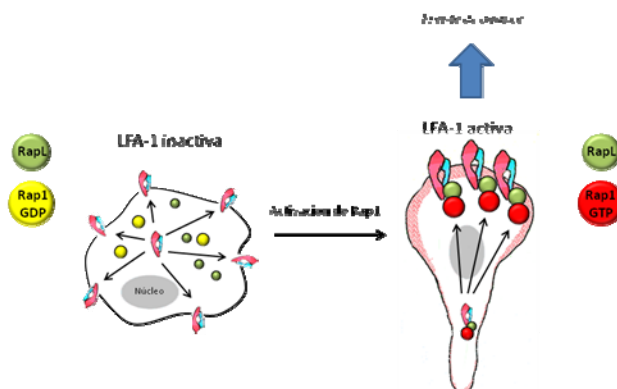
Figura 3.3: Representación esquemática de la vía de señalización desde la estimulación de un agonista hasta la activación de las integrinas (señalización ‘inside-out’) (Adaptado de Malinin et al, 2010)

Rap1 produce la translocación de la talina desde el citoplasma a los complejos de integrinas pero, de forma sorprendente, no estimula la fosforilación de talina o el corte proteolítico entre los dominios cabeza globular y bastón de la talina, que son los modelos más aceptados para inducir su activación (Han et al, 2006; Critchley, 2005), de modo que, una explicación para el efecto de Rap1 en talina podría ser la inducción de un cambio conformacional que permitiera la translocación y, finalmente, la activación de la integrina. Recientemente, se ha demostrado que la activación de la integrina Mac-1 mediada por Rap1 depende de los residuos situados entre las posiciones 732 a 761 de la cadena $\beta 2$ y que Rap1 actúa antes que talina (Lim et al, 2010). Esta región $\beta 2$ contiene dos residuos conocidos por controlar la unión de la cabeza globular, el triptófano 747 y la fenilalanina 754, siendo este último parte del motivo altamente conservado NPXY que se encuentra en las colas β de las integrinas (Liu et al, 2000), y ambos esenciales para una activación ‘inside-out’ máxima de la integrina Mac-1 en macrófagos (Lim et al, 2007). Además, en esta región también se encuentra la serina 756, que fosforilada ha demostrado ser necesaria para que Rap1 se reclute a la integrina (Lim et al, 2011), lo que concuerda con los resultados obtenidos para otras integrinas como las $\beta 1$, en las que la serina 785 fosforilada se ha implicado en diversos eventos mediados por integrinas incluyendo adhesión, extensión celular y migración (Mulrooney et al, 2001). Aunque este residuo es clave para la localización de Rap1 en las proximidades de la integrina, sólo está parcialmente implicado en el reclutamiento de talina a la cadena β , por lo que no puede descartarse que haya otras moléculas involucradas en el proceso (Lim et al, 2011).

3.1.3. RapL y RIAM como efectores en el mecanismo molecular de activación de las integrinas por Rap1

En linfocitos y células dendríticas, el efector de Rap1 RapL, un regulador de la adhesión celular de elevada expresión en tejidos linfoides, parece jugar un papel crucial en la adhesión dependiente de la integrina $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ tras la activación del TCR o de receptores de quimioquinas (Katagiri et al, 2003). RapL es una proteína de 265 aminoácidos con un dominio central de unión a Rap1, denominado RA, y un dominio C-terminal de tipo coiled-coil, llamado SARAH, siendo ambos necesarios para la interacción con Rap1 (Katagiri et al, 2003). Rap1 unido a GTP induce la formación de un complejo formado por RapL y LFA-1 ($\alpha\text{L}\beta\text{2}$) que cambia la afinidad, actuando en vías de señalización 'inside-out' que resultan en un aumento de la adhesión, y la distribución espacial de esta integrina, permitiendo la polarización de la célula en un lamelipodio de avance (Kinashi y Katagiri, 2004). El mecanismo de modulación de la afinidad aún no está claro, pero parece estar relacionado con la secuencia GFFKR de la cadena αL , implicada en la estabilización de la interacción citoplasmática entre las cadenas α y β de la integrina. De esta forma, la formación de un complejo con RapL que contiene a la subunidad αL desestabilizaría la formación del heterodímero de la integrina, resultando en un aumento de la capacidad de la misma para unir ligando (Kinashi y Katagiri, 2004). Recientemente se ha constatado que mutaciones específicas en la quinasa Mst1, que interacciona con RapL, suprimen tanto la coinmunoprecipitación de RapL con Rap1 como la polarización de la integrina $\alpha\text{L}\beta\text{2}$, sugiriendo que sería esta proteína la mediadora de la actividad de Rap1 sobre la subunidad αL de la integrina dependiente de RapL (Katagiri et al, 2006). RapL también está presente en plaquetas, donde podría jugar un papel análogo (Crittenden et al, 2004), sin embargo, se encuentra ausente de muchos otros tipos celulares que forman contactos mediados por integrinas con la matriz extracelular, por lo que no puede considerarse como un efector universal que medie la señalización 'inside-out' que activa a las integrinas a través de Rap1.

Figura 3.4: Modelo para la activación de LFA-1 por RapL y Rap1. En células no estimuladas, la integrina LFA-1 se distribuye uniformemente en la membrana plasmática a través de mecanismos de endocitosis y reciclaje. Tras la activación de Rap1, se inicia la polarización celular, generando el urópodo: RapL forma un complejo con LFA-1 y se transloca al frente de avance (Adaptado de Kinashi y Katagiri, 2004)



Un hallazgo revelador para desentrañar un posible mecanismo molecular general que permita a Rap1 activar a las integrinas a través de la talina, fue el descubrimiento de que en la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ en plaquetas, la molécula efectora implicada en dicha función era RIAM (Han et al, 2006). RIAM (de *Rap1-GTP-interacting adaptor molecule*), es una proteína de 665 aminoácidos, originalmente aislada en linfocitos T, donde interacciona con la forma activa de Rap1 permitiendo su traslocación a la membrana plasmática tras estimulación (Ménasche et al, 2007; Lafuente et al, 2004), e induce cambios en la afinidad de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ (Lafuente et al, 2004). De forma interesante, RIAM coinmunoprecipita con talina (Lee et al, 2009) y ambas proteínas colocalizan en las adhesiones focales de forma temprana en su formación (Worth et al, 2010).

RIAM pertenece a la familia MRL (Mig-10/RIAM/Lamellipodin) de proteínas adaptadoras, cuyos miembros están presentes en organismos desde *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* hasta humanos, mostrando los análisis filogenéticos de los mismos, un alto grado de conservación a través de la evolución. (Lafuente et al, 2004). Esta molécula se caracteriza por poseer un dominio RA (*Ras-association domain*, o dominio de asociación a Ras), que media su interacción con Rap1, hacia cuyo N-terminal se encuentra una zona rica en prolinas enmarcada por dos regiones potenciales coiled-coil (aminoácidos del 62 al 89 y del 149 al 181). Más hacia el C-terminal del dominio RA reside un dominio PH (dominio de homología a plekstrina), con especificidad de unión a fosfatidilinositol monofosfato, fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-4-fosfato y fosfatidilinositol-5-fosfato (Jenzora et al, 2005), y una segunda región rica en prolinas (Lafuente et al, 2004). Esta proteína adaptadora se localiza en el frente de avance de los lamelipodios, donde interacciona con proteínas reorganizadoras de la actina como profilina y Ena/VASP (Jenzora et al, 2005; Lafuente et al, 2004). Este hecho, unido a que la sobreexpresión de RIAM en linfocitos T induce extensión celular y la formación de lamelas, a la vez que la inhibición de su expresión disminuye el contenido de F-actina en la célula, hace pensar que pueda tener un papel importante en la regulación del citoesqueleto de actina (Lafuente et al, 2004).

La sobreexpresión de RIAM desencadena la activación de las integrinas dependiente de talina, y consecuentemente, su depleción en células CHO reconstituidas con la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ hace descender de forma efectiva la activación de las éstas inducida tanto por un mutante constitutivamente activo de Rap1, Rap1V12, como por el receptor activado por proteasas de trombina (PAR, de *thrombin receptor/protease activated receptor*) (Han et al, 2006). También el uso de un RNA interferente frente a RIAM en células T Jurkat inhibe la adhesión de integrinas a fibronectina extracelular (Watanabe et al, 2008; Han et al, 2006; Lafuente et al, 2004). La naturaleza de la interacción Rap1-RIAM, sin embargo, sugiere algún nivel de complejidad, ya que RIAM es capaz de modular la distribución de Rap1 activo, como demuestran experimentos en los que su ausencia produce la inhibición de la translocación de Rap1 activo a la membrana plasmática tras la activación del TCR (Lafuente et al, 2004). Estos datos se encuentran en concordancia con los de otro artículo en el que se muestra como la activación del TCR en linfocitos T produce el reclutamiento de Rap1 a la sinápsis inmunológica a través del módulo formado por las proteínas adaptadoras SKAP55 (de *Src kinase-associated*

phosphoprotein) y ADAP (de *Adhesion and Degranulation-Promoting Adapter Protein*), que al interactuar con RIAM, permite la relocalización de Rap1 activo unido a la misma en la membrana plasmática y la inducción, de este modo, de la activación de las integrinas (Ménasché et al, 2007). Este estudio identificó la secuencia que comprende los dominios RA-PH de RIAM como la región vía la que se producía la asociación con SKAP55; al ser éstas las regiones con las que RIAM interactúa también con Rap1 (dominio RA) y con fosfoinosítoles (dominio PH), queda en el aire la pregunta de cómo pueden producirse las distintas interacciones con las mismas regiones de la proteína, lo que conduce a la posibilidad de que diferentes reservas de RIAM puedan estar implicadas en distintas interacciones y funciones. En este sentido, también se ha mostrado que RIAM es capaz de regular otros eventos derivados de la señalización a partir del TCR, mediante la interacción de su región C-terminal rica en prolinas con el dominio SH3 de la fosfolipasa γ (PLC γ). De esta forma, tras la activación del TCR, RIAM regularía el reclutamiento de la PLC γ al citoesqueleto de actina, un proceso esencial para la actividad de esta fosfolipasa en cuanto a su capacidad de activar la producción de inositol-3-fosfato y liberar Ca^{2+} intracelular, con el consiguiente impacto sobre la actividad de factores de transcripción que terminan por conducir a la síntesis de interleuquina-2 (Patsoukis et al, 2009).

Por otra parte, la zona N-terminal de RIAM ha mostrado ser la encargada de interactuar con la talina. En un conjunto de experimentos diferentes, la expresión de una fusión entre el pequeño motivo del N-terminal de RIAM, que está predicho forma una hélice anfipática, y la caja CAAX situada en el C-terminal de Rap1, es suficiente para translocar a talina hasta los complejos de integrinas (Lee et al, 2009). Mientras que las dependencias intermoleculares aún no se comprenden por completo, es muy posible que RIAM realice una función de andamiaje uniéndose a Rap1, lo que permitiría el subsecuente anclaje de talina y la activación de integrinas. Este modelo ha conseguido ser corroborado por experimentos de microscopía en células vivas, en los que se usaba complementación bimolecular fluorescente (Watanabe et al, 2008).

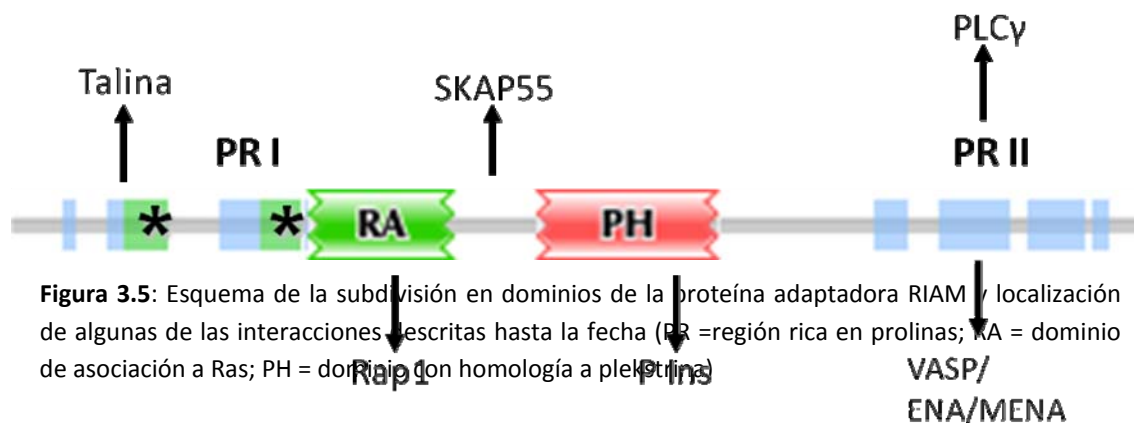


Figura 3.5: Esquema de la subdivisión en dominios de la proteína adaptadora RIAM y localización de algunas de las interacciones descritas hasta la fecha (PR = región rica en prolinas; RA = dominio de asociación a Ras; PH = dominio con homología a plektulina)

3.1.4. Implicación de Rap1 en procesos fagocíticos dependientes de integrinas

Los primeros indicios de una relación de Rap1 con fagocitosis vienen de estudios del proceso en *Dyctiostelium discoideum*, donde se ha mostrado que esta GTPasa es capaz de regular positivamente la fagocitosis y negativamente la macropinocitosis (Seastone et al, 1999). En este modelo se presenta a Rap1 funcionando en las proximidades de la membrana plasmática como parte de una vía de transducción de señales situada a partir de la activación de la PLC, a través de diacilglicerol y Ca^{2+} , para regular los pasos tempranos de internalización de la partícula, ya que otros pasos más tardíos como pueden ser la síntesis de hidrolasas, el procesamiento proteolítico y el desarrollo de fagolisosomas no parece afectado por su actividad (Seastone et al, 1999).

Hasta hace pocos años, aunque Rap1 había sido implicado en la señalización *'inside-out'* hacia varias integrinas (revisado por Caron, 2003), el papel de este tipo de señalización en la fagocitosis mediada por integrinas dependiente de complemento en mamíferos aún no había terminado de esclarecerse, ya que la mayoría de los estudios tradicionalmente se habían centrado en las integrinas de tipo $\beta 1$ y $\beta 3$ (Shattil, 2009; Abram y Lowell, 2009; Liu et al, 2000). Sin embargo, recientemente, se ha establecido firmemente que tanto Rap1 como talina son también reguladores esenciales de la activación *'inside-out'* de la integrina $\alpha M\beta 2$. La talina es crucial para que se produzca la fagocitosis mediada por esta integrina en macrófagos, ya que la interacción de la cabeza globular N-terminal de la talina con la cola citoplasmática de la cadena $\beta 2$ es necesaria y suficiente para que se produzca la activación *'inside-out'* de la integrina, y una unión óptima de partículas opsonizadas por el complemento (Lim et al, 2007). Por otro lado, se ha comprobado que Rap1 es activado por una gran variedad de agonistas y mediadores conocidos por promover la unión y actividad fagocítica de la integrina $\alpha M\beta 2$, incluyendo ésteres de forbol, LPS, $\text{TNF}\alpha$ y el factor activador de plaquetas (PAF) (Caron et al, 2000). Al contrario que la cabeza globular de la talina, que tiene la capacidad de rescatar la unión de partículas pero no la internalización cuando se expresa en células deficientes en talina (Lim et al, 2007), la expresión de Rap1 activo en macrófagos es suficiente para inducir una unión máxima y la consecuente internalización de las partículas (Caron et al, 2000). Sin embargo, aún no se ha podido dilucidar cómo es la secuencia exacta de acontecimientos por los cuales Rap1 y talina son capaces de regular la unión mediada por $\alpha M\beta 2$ y la fagocitosis de ligandos opsonizados con el complemento. Sí que se ha conseguido demostrar, en fibroblastos embrionarios de ratón en los que la respuesta a un mutante constitutivamente activo de Rap1 se ve reducida al suprimir la expresión de talina, que Rap1 actúa antes que la talina para regular la actividad de unión a ligando de la integrina y la extensión celular del macrófago, controlando el reclutamiento a las zonas de unión a la partícula (Lim et al, 2010).

Rap1 actúa sobre la cadena $\beta 2$ y no sobre la cadena αM , demostrando estudios de delección que la región afectada en el dominio citoplasmático de la cadena $\beta 2$ comprende los residuos situados entre las posiciones 732 y 761, siendo esta región fundamental para la activación de la integrina por Rap1 (Lim et al, 2010) y un requerimiento clave la fosforilación de la serina

situada en la posición 756 para que se produzca el reclutamiento de la GTPasa a las proximidades de la integrina (Lim et al, 2011). De forma importante, los residuos triptófano 747 y fenilalanina 754 son esenciales para que se produzca la asociación de la talina y la activación de la integrina (García-Álvarez et al, 2003). También resulta interesante que el triplete de treoninas en las posiciones 758 a 760 en la subunidad $\beta 2$ sea el encargado de controlar el reclutamiento de RhoA y la polimerización de actina tras la activación de la integrina $\alpha M\beta 2$ (Wiedemann et al, 2006), y no sea relevante para la activación de la integrina a través de Rap1, confirmando una separación efectiva entre las vías de señalización *'inside-out'* (Rap1) y *'outside-in'* (RhoA).

Los candidatos a efectores en este proceso de activación *'inside-out'* mediado por Rap1 podrían restringirse a RapL o RIAM. Sin embargo, los ratones deficientes en RapL sólo muestran anomalías en órganos linfoides, lo que correlaciona con su expresión restringida a estos tejidos, pero sin que se observen defectos en adhesión o en fagocitosis en ellos (Katagiri et al, 2004). RIAM ya ha demostrado que estimula la adhesión dependiente de las integrinas $\alpha L\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$ en células Jurkat (Lafuente et al, 2004; Han et al, 2006) y es responsable junto con talina de la activación dependiente de Rap1 de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ (Han et al, 2006), por lo que no puede descartarse que realice funciones parecidas con la integrina $\alpha M\beta 2$. Sin embargo, recientemente (y una vez que el estudio que nos ocupa ya había sido empezado), han aparecido algunas evidencias en su contra, al menos en trabajos realizados en líneas celulares de macrófagos de ratón, en las cuales el silenciamiento de RIAM no tiene efecto en la unión dependiente de $\alpha M\beta 2$ y la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con iC3b, sugiriendo que esta proteína no está implicada en la señalización *'inside-out'* a través de la integrina $\alpha M\beta 2$. Es más, en estos estudios, al contrario que talina, la sobreexpresión de RIAM en macrófagos o células transfectadas con $\alpha M\beta 2$ no parece suficiente para incrementar la unión de partículas opsonizadas con el complemento, mientras que su inhibición tampoco resulta en su merma (Lim et al, 2010). A pesar del rol universal de Rap1 señalizando en la activación de diferentes heterodímeros de integrinas y tras la experiencia con $\alpha L\beta 2$ en la que tanto RapL como RIAM parecen estar implicados como efectores de Rap1, sería concebible que otros efectores diferentes de los ya mencionados pudieran mediar la señalización *'inside-out'* a partir de Rap1 para distintas integrinas. En cualquier caso, los mecanismos que conectan a Rap1 con la activación de las integrinas y su dependencia de talina aún están pendientes de ser completamente elucidados para la integrina $\alpha M\beta 2$.

OBJETIVOS

1. Estudiar la implicación de RIAM en la regulación de la actividad de la integrina $\alpha M\beta 2$
2. Analizar la posible participación de RIAM en el proceso de fagocitosis mediado por complemento
3. Estudiar el posible papel de RIAM como efector de Rap1 regulando la señalización *'inside-out'* hacia las integrinas fagocíticas
4. Analizar el papel de RIAM en el reclutamiento de talina a los contactos fagocíticos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO CELULAR

1.1. Cultivo de la línea celular HL60

La línea promonocítica HL60 ([Gallagher et al, 1979](#)) fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-Glutamina, Penicilina a 100 unidades/ml y Estreptomicina a 100 µg/ml (Lonza Biologics) a 37°C con un 5% de CO₂. El cultivo se mantuvo siempre sin exceder la densidad celular de un millón de células/ml como se recomienda para evitar la diferenciación espontánea de la línea ([Fleck et al, 2003](#)).

Para inducir su diferenciación al linaje neutrofílico, se les realizó un tratamiento con 1 µM de ácido retinoico (SIGMA) durante cuatro días, mientras que para diferenciarlas a macrófagos se las trató con 20 ng/ml del éster de forbol PMA (SIGMA) durante al menos 48 horas. En ambos casos, se monitorizó el incremento en la expresión de los marcadores de superficie de diferenciación celular CD11b y CD11c mediante citometría de flujo, para asegurar la diferenciación.

1.2. Cultivo de la línea celular THP-1

La línea celular THP-1 ([Tsukiya et al, 1980](#)) se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de FBS, 2 mM de L-Glutamina, Penicilina a 100 unidades/ml y Estreptomicina a 100 µg/ml (Lonza Biologics) a 37°C con un 5% de CO₂.

La diferenciación a células de la estirpe monocítica se consiguió mediante la introducción de 20 ng/ml de PMA (SIGMA) en el cultivo durante 48 horas. El método utilizado para comprobar dicha diferenciación fue, de nuevo, el incremento en la expresión de los marcadores de superficie CD11b y CD11c.

1.3. Cultivo de la línea celular HEK293T

Esta línea, utilizada como células empaquetadoras en el proceso de infección de las células HL60, THP-1 y macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica ([He et al, 1998](#)), se

mantuvo en medio DMEM suplementada con un 10% de FBS, 2 mM de L-Glutamina, Penicilina a 100 unidades/ml y Estreptomicina a 100 µg/ml (Lonza Biologics) a 37°C con un 5% de CO₂.

1.4. Generación de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (MDMs, de *monocyte-derived macrophages*)

Los leucocitos mononucleares humanos (PBMCs, de *peripheral blood mononuclear cells*) fueron obtenidos por aislamiento de concentrados de células sanguíneas (*buffy coats*) procedentes de donantes anónimos y preparados por el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid (Avda de la Democracia s/n, 28032, Madrid), mediante un gradiente de densidad obtenido por centrifugación. Los *buffy coats* fueron diluidos en proporción 1:1 con medio RPMI 1640 sin suplementos, y depositados sobre Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), tras lo cual se centrifugaron a 800g durante 30 minutos a temperatura ambiente, produciéndose la separación de los distintos componentes celulares de la sangre. Los PBMCs fueron recogidos de la interfase formada en la mitad del tubo y lavados una vez con PBS. A continuación se procedió a eliminar los eritrocitos contaminantes mediante la resuspensión de las células en un tampón de lisis de eritrocitos compuesto por 150 mM NH₄Cl, 10 mM HCO₃Na y 0,1 mM EDTA, durante 10 minutos en hielo. Se lavó una vez más con PBS para eliminar los restos del tampón de lisis y se contaron las células para ser pasadas por una columna de selección positiva que usa el marcador CD14 unido a bolas magnéticas para purificar únicamente los monocitos presentes en la preparación (*MACS®Cell separation columns & reagents*, Miltenyi Biotec). De forma breve, se centrifugaron las células a 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió el precipitado celular añadiendo 80 µl de una solución que contenía 0,5% FBS 2 mM EDTA en PBS (solución MACS) por cada 10⁷ células. Una vez resuspendidas, las células se incubaron con 8 µl de anticuerpo anti-CD14 acoplado a bolas magnéticas por cada 10⁷ células durante 15 minutos a 4°C en rotación orbital en una noria, después de lo cual se lavaron con 2 ml de solución MACS por cada 10⁷ células y se centrifugaron a 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el anticuerpo no unido. Las células así marcadas magnéticamente, se resuspendieron en una relación número/volumen de 500 µl por cada 10⁸ células para ser cargadas en la columna imantada, que previamente se equilibró con 3 ml de solución MACS. Con este tipo de separación, las células CD14 positivas quedan retenidas en la columna, mientras que las células negativas pasan a través de ella, haciéndose necesario lavar la columna hasta un número mínimo de 3 volúmenes de la misma para eliminar por completo aquellas células que se hayan quedado retenidas en la columna mediante uniones inespecíficas. Una vez se realizaron los lavados se procedió a la elución para la que se usaron 5 ml de solución MACS aplicados a la parte superior de la columna y un émbolo similar al de una jeringuilla, que se incluye en el kit de separación comercial, y que produce que las células seleccionadas dejen de estar unidas al soporte imantado utilizando para ello fuerza mecánica.

Una vez purificados los monocitos, se plaquearon en placas de cultivo de 24 pocillos (Grenier) a una densidad de un millón de células/ml en 2 ml de RPMI 1640 suplementado con un 10% de FCS, 2 mM de L-Glutamina, Penicilina a 100 unidades/ml y Estreptomicina a 100 µg/ml (Lonza Biologics) en presencia de 1000 unidades/ml de GM-CSF humano (Immunotools). Se dejaron diferenciando en estas condiciones a 37°C con un 5% de CO₂ durante cinco días hasta obtener plena morfología de macrófagos, momento en el cual se les realizó una infección lentiviral para silenciar la expresión de la proteína adaptadora RIAM.

2. SILENCIAMIENTO DE RIAM EN LOS SISTEMAS CELULARES UTILIZADOS

2.1. Transducción lentiviral

Para realizar esta transducción se usaron los plásmidos ya descritos pRLL3.7 expresando un shRNA para RIAM con secuencia GCTGAGCAGAGGACAATCCTTCAAGAGAGGATTGTCCTCTGCT CAGC, y un pRLL3.7 que expresa un shRNA para la lamellipodin de ratón como control (Lafuente et al, 2004). Ambos plásmidos codifican también para el gen de la proteína GFP situado bajo el control del promotor CMV, de forma que el vector produce simultáneamente un shRNA y un gen reportero (Rubinson et al, 2007).

La transducción comenzó con la transfección de 1,5 µg de cada plásmido lentiviral junto con 1 µg del plásmido pCMVΔR8.9 y 0,5 µg del plásmido pMDG-VSV, ambos vectores empaquetadores que expresan, el primero las proteínas estructurales del virus codificadas por los genes *gag* y *pol*, y el segundo la proteína de la envuelta del virus, en células HEK293T subconfluentes en placas de cultivo de 6 pocillos (Grenier) usando como reactivo para conseguir la transfección el JetPei de Polyplus (6 µl) en una solución de NaCl 150 mM estéril.

Transcurridas 48 horas de producción de los sobrenadantes virales, se añadieron éstos a las células a transducir (a 500000 células en el caso de las líneas HL60 y THP-1 ó a dos millones de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica diferenciados con GM-CSF, en todos los casos en placas de cultivo de 24 pocillos) en presencia de 10 µg/ml de polibreno (SIGMA), centrifugándose las placas a 2200 rpm durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente para conseguir la deposición de los virus sobre las células y la subsecuente infección por parte de los mismos.

Habiendo transcurrido 48 horas desde la transducción, la eficiencia fue comprobada por la presencia de fluorescencia de tipo GFP asociada al plásmido lentiviral, siendo los MDMs derivados a experimentos de fagocitosis y PCR cuantitativa en tiempo real, mientras que las

células HL60 fueron seleccionadas por la técnica de separación celular por citometría de flujo en base a la expresión de GFP (*Cell sorting*) para la consecución de una línea estable interferida para RIAM. La separación celular fue llevada a cabo usando el equipo FACSCVantage SE (BD Biosciences) situado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CBM-SO (c/Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid), comprobándose posteriormente por western blot que la interferencia se mantenía en las células por espacios de tiempo superiores a un mes.

2.2. Transducción retroviral

Como método para realizar una segunda interferencia de distinto tipo que asegurara los resultados obtenidos con el silenciamiento de RIAM producido por el vector lentiviral, se usaron cuatro oligonucleótidos específicos shRNA para RIAM clonados en el vector retroviral pRS (*Hush®shRNA Plasmid Panels (29-mer)*, OriGene). Entre ellos se seleccionó, por su eficiencia en el silenciamiento comprobada por western blot, el de secuencia GGAGCAAGATTTTCATGTCAGACCTCATGA. Como plásmido control se contó con el plásmido comercial pTR003 (OriGene), conformado por el vector pRS con expresión del shRNA para la proteína GFP. Ambos vectores codifican también para el gen de resistencia al antibiótico puromicina.

La transducción se realizó utilizando el protocolo para la transducción lentiviral descrito arriba, con la salvedad del cambio del vector codificante para las proteínas estructurales del virus; en este caso se usó un vector específico para retrovirus denominado pMLV-GP. Se infectaron 500000 células de la línea celular HL60 en placas de cultivo de 24 pocillos (Grenier) y 48 horas después se les añadió puromicina (SIGMA) a 0,6 µg/ml como método de selección por supervivencia de las células transducidas satisfactoriamente. De este modo se consiguió la generación de una nueva línea interferida para RIAM de forma estable, habiéndose comprobado por western blot que la interferencia se mantiene, también en este caso, por espacios de tiempo superiores a un mes.

3. ENSAYOS DE EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE INTEGRINAS

3.1. Ensayos de expresión de integrinas

Para el estudio de la expresión de los marcadores de superficie de diferenciación CD11b y CD11c se utilizaron técnicas de tinción con anticuerpos específicos frente a estas cadenas de

las integrinas $\alpha\text{M}\beta 2$ y $\alpha\text{X}\beta 2$. En concreto se usaron el anticuerpo denominado Bear-1, que reconoce a la subunidad αM (CD11b) y el llamado HC1/1, que reconoce a la subunidad αX (CD11c), siendo ambos un donativo de F. Sanchez-Madrid (HU de La Princesa, Madrid). Se usaron 400000 células diferenciadas previamente sobre las que es necesario, dado el carácter promonocítico de las líneas a ensayar, realizar un bloqueo inicial de los receptores de Fc antes de empezar con las tinciones inmunológicas. Este bloqueo se consigue por incubación de las células 30 minutos a 4°C con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de γ -Globulina humana (SIGMA). Tras esta incubación, se plaquearon las células en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Grenier) en presencia de 1 μg del anticuerpo correspondiente durante 30 minutos a 4°C, después de lo cual se lavaron tres veces con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo unido a las células, centrifugando entre lavados para retener las células en la placa a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Las células así unidas a los anticuerpos fueron incubados 30 minutos a 4°C con un anticuerpo anti-ratón AlexaFluor®-647 (Invitrogen) a una dilución 1:300, repitiéndose el mismo proceso de lavado para retirar el exceso de anticuerpo. Este anticuerpo anti-ratón se encuentra conjugado con un fluoróforo que emite en la longitud de onda del rojo lejano ($\lambda=647$), lo que permite recoger los datos de la presencia de las cadenas de integrina mencionadas usando para ello el citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), situado en el departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (Avda Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid).

Los resultados fueron analizados con el software FlowJo (BD Biosciences), asociado a este citómetro, y representados como una superposición de los datos de fluorescencia para los anticuerpos frente a las integrinas sobre el blanco proporcionado por el control de isotipo utilizado en la tinción.

3.2. Ensayos de activación de integrinas (Ensayos realizados en colaboración con la Dra. Elena Rodríguez García, del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid)

En estos ensayos se utilizó, de nuevo, el anticuerpo Bear-1 que representa la expresión basal de la integrina como control del experimento, así como un anticuerpo que permite medir su grado de activación, el CBRM1/5 (BioLegend) que reconoce a la integrina activa uniéndose al dominio I de la cadena CD11b.

Se usaron 400000 células diferenciadas previamente, que fueron activadas antes de comenzar la tinción por incubación en buffer HBS (20 mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mg/ml Glucosa) con 1mM de MgCl_2 y 1 mM de CaCl_2 a 37°C durante 10 minutos con diferentes estímulos que se ha descrito producen la activación de la integrina $\alpha\text{M}\beta 2$ y estimulan la fagocitosis, como son

el fMLP (100 nM, SIGMA) y el LPS (3 µg/ml, SIGMA), o resuspendidas directamente en buffer HBS con 1 mM de MnCl_2 . Tras esta incubación y el bloqueo de los receptores de Fc con 20 µg/ml de γ -Globulina humana, las células fueron plaqueadas en placas de 96 pocillos de fondo redondo junto con 1 µg de cada uno de los anticuerpos 20 minutos a 37°C, temperatura requerida para el cambio de conformación de la integrina a su estado activo, para después ser lavadas tres veces con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo unido a las células, realizando centrifugaciones entre lavados para retener las células en la placa a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, como en el protocolo anterior. Una vez lavadas, se incubaron las células unidas al anticuerpo con el anticuerpo anti-ratón AlexaFluor®-647 a una dilución 1:500 durante 30 minutos a 4°C, tras lo que se les realizó un nuevo proceso de lavado igual en todo al anterior, y se midió la fluorescencia en el citómetro.

Los resultados se analizaron con el programa FlowJo ya citado y fueron representados utilizando la media de la intensidad de fluorescencia que producía la unión del CBRM1/5 relativa a la media de la intensidad de fluorescencia de la unión del anticuerpo Bear-1, como índice para expresar el número de moléculas totales que están siendo activadas. Además se analizaron los perfiles de citometría en los que se representó la superposición de los datos de fluorescencia para el anticuerpo CBRM1/5 con el estímulo fMLP, sobre el blanco proporcionado por las células en condiciones basales sin estimular y el positivo que daría siempre el uso de Mn^{2+} que activa a la integrina por su unión al lugar que uniría el ligando.

4. PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL FRENTE A RIAM

El anticuerpo policlonal para RIAM fue obtenido mediante inmunización de un conejo de raza New Zealand mediante la inyección subcutánea de una proteína recombinante GST fusionada con la parte C-terminal de RIAM (aminoácidos 480 a 665), obtenida por clonaje de la misma en un plásmido pGEX-6P1 (Amersham Pharmacia Biotech) como ya se había descrito con anterioridad (Lafuente et al, 2004).

Para obtener dicha proteína de fusión (llamada GST-RIAM C-terminal), se inocularon 10 µl del glicerol de bacterias transformadas con el plásmido en cuestión en un preinóculo de 25 ml de medio LB (SIGMA) con 100 µg/ml de ampicilina (SIGMA) que se dejó creciendo durante toda la noche en un agitador a 37°C y 220 rpm. A la mañana siguiente se amplificó el cultivo pasándolo a 250 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y se dejó crecer de nuevo en el agitador a 37°C y 220 rpm hasta obtener una densidad óptica medida en un espectrofotómetro Ultrospec Plus (Pharmacia) a 600 nm de entre 0.9 y 1, momento en el que se centrifugaron las bacterias a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en una

centrifuga de mesa Sorvall superT21 (Sorvall® Centrifuges), para proceder a la inducción. Esta inducción se consiguió resuspendiendo el precipitado bacteriano en 250 ml de medio fresco LB con 100 µg/ml de ampicilina y añadiendo 100 µM de IPTG (SIGMA) para estimular la producción de proteína por las bacterias, incubándose las mismas en estas condiciones durante 3 horas a 37°C a 220 rpm. Transcurrido este tiempo, se precipitaron las bacterias por centrifugación en la centrífuga Sorvall durante 5 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente, resuspendiéndose los precipitados resultantes en 15 ml de PBS frío suplementado con 2 mM de ortovanadato sódico, 1 mM de PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas comercial (SIGMA), tras lo que se lisaron en una French press situada en el Centro de Investigaciones Biológicas, CIB (c/Ramiro de Maeztu, 9, 28040, Madrid).

Una vez lisadas las bacterias, se procedió a la purificación de la proteína mediante el uso de una columna de glutatión agarosa (*Glutathione-agarose*, SIGMA). Para ello, se realizó un paso previo de solubilización de las proteínas presentes en el lisado bacteriano por incubación del mismo durante 1 hora a 4°C en rotación orbital en una noria con un 1% sobre el volumen final de la muestra de Tritón X-100 (SIGMA), después de lo cual se centrifugó en la centrífuga Sorvall durante 10 minutos a 9000 rpm y a 4°C y se filtró el sobrenadante resultante con un filtro de 0,45 µm como medio para clarificar el lisado y eliminar restos celulares y los posibles cuerpos de inclusión formados durante el proceso. La incubación de la muestra de lisado bacteriano y la resina de glutatión agarosa se realizó en rotación orbital en una noria a 4°C a un ratio de 125 µl de resina seca por cultivo y se extendió en el tiempo durante 2 horas y 30 minutos, tras lo que se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos a 4°C para obtener como precipitado la resina ya unida a la proteína recombinante. Se descartó el sobrenadante resultante y se realizaron cuatro lavados de la resina con PBS frío, centrifugando en los intervalos a 1200 rpm 3 minutos a 4°C para recuperar la resina. Para eluir la proteína, se incubó esta resina con un volumen de la misma de glutatión reducido (SIGMA) durante 1 hora a 4°C en rotación orbital en la noria para luego centrifugar a 1200 rpm 3 minutos a 4°C, recuperándose el sobrenadante ya con la proteína purificada. Este sobrenadante se analizó mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie (SIGMA) para poder constatar la eficiencia de purificación, y mediante western blot, usando un anticuerpo policlonal frente a RIAM amablemente cedido al efecto por V. Boussiotis (Dana Farber Cancer Institute, Boston (MA), USA), para comprobar que la proteína obtenida es la de interés para el experimento, tras lo que se dializó la muestra frente a PBS para retirar el glutatión reducido y se cuantificó usando el kit *RC DC Protein Assay* de Bio-Rad.

Para la producción de anticuerpos en el animal, se realizaron tres inmunizaciones con 100 µg de la proteína de fusión obtenida en intervalos de dos semanas, en proporción 1:1 con coadyuvante de Freund (SIGMA), siendo monitorizado el antisuero resultante durante todo el periodo mediante western blot. Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con la normativa Europea y Española, cumpliendo con todas las regulaciones de protección y uso de animales de experimentación, y fue aprobado previamente por el Comité de Experimentación Animal (CEA) de la Universidad Complutense de Madrid, de acuerdo con todas las directrices externas e internas de bioseguridad y bioética.

El antisuero final fue precipitado usando sulfato amónico saturado y purificado usando columnas de proteína A sefarosa (*Protein A sepharose*®, Amersham Biosciences), en un rango de 500 µl de resina seca por cada 2 ml de antisuero de conejo, obteniéndose el anticuerpo policlonal purificado a una concentración de 1 µg/µl.

5. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

5.1. Western blot

Para la preparación de los lisados, las células a analizar fueron lavadas con PBS y lisadas con un buffer de lisis que contiene 50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10% Glicerol y 1% NP40 (SIGMA) suplementado con 2 mM de Ortovanadato sódico, 1 mM de PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas comercial (SIGMA).

El lisado fue cuantificado usando el kit *RC DC Protein Assay* de Bio-Rad usándose 60 µg de cada muestra para la separación por SDS-PAGE, tras la que se realizó un protocolo estándar para western blot mediante transferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa usando 300 mA durante 1 hora y 30 minutos a 4°C. Una vez transferidas las proteínas, se bloqueó la membrana con un 5% de leche y un 3% de BSA en una solución 50 mM Tris-HCl pH 8.0 150 mM NaCl 0,05% Tween (TN-Tween) y se incubó con los anticuerpos indicados en cada caso, el policlonal anti-RIAM producido en nuestro laboratorio a dilución 1:500 en un 4% de leche en TN-Tween, el anticuerpo anti-Tubulina (SIGMA) a dilución 1:8000 en un 0,5% de leche en TN-Tween, o el anticuerpo anti-Rap1 (SantaCruz Biotechnology Inc) a dilución 1:500 en un 0,5% de leche en TN-Tween, a 4°C durante toda la noche en un balancín. Después de esta incubación, se lavaron las membranas tres veces durante 10 minutos con la solución TN-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa indicado para cada anticuerpo, el anti-ratón HRP (SIGMA) a dilución 1:1000 en 0,5% de leche en TN-Tween para el anti-Tubulina y el anti-conejo HRP (SIGMA) a dilución 1:5000 en 0,5% de leche en TN-Tween para el anti-RIAM y el anti-Rap1, durante 30 minutos a temperatura ambiente en un balancín, al final de la cual se repitió una nueva tanda de lavados. El revelado se realizó usando una solución de ECL compuesta por 1,25 mM Luminol 2 µM p-Cumárico (SIGMA) en 100 mM de Tris-HCl pH 8.5 a la que se le añade 7,1 µl de agua oxigenada al 30% en el mismo momento y usando una máquina de revelado Curix 60 de AGFA, siendo el resultado de emisión de luz recogido con películas Curix RP2 Plus (AGFA).

La densitometría de las bandas, cuando fue necesario, se realizó utilizando el equipo Gel-doc 2000, junto con el software asociado Multi-Analyst, los dos de BioRad. La densidad relativa de la banda se obtuvo a partir de los valores del área de los picos de densidad óptica por el porcentaje de densidad de los picos de todos los perfiles de banda recogidos relativizando todos los resultados a los controles basales, a los que se les otorgó el valor 100 de partida.

5.2. Pull-down

El estado de activación de la proteína Rap1 (Rap1-GTP) se determinó mediante ensayos de pull-down usando una proteína recombinante formada por el dominio de unión a Rap del efector RalGDS fusionado a la proteína GST.

Para obtener la proteína GST-RalGDS-RBD, se inocularon 10 µl del glicerol de bacterias transformadas con el plásmido pGEX6P1 RalGDS-RBD, donación de V. Boussiotis (Dana Farber Cancer Institute, Boston (MA) USA) en un preinóculo de 25 ml de medio LB (SIGMA) con 100 µg/ml de ampicilina (SIGMA) tras lo que se siguió el mismo protocolo de inducción de proteínas que para la GST-RIAM C-terminal, con la salvedad del tiempo de inducción, que aquí fue de 2 horas a 37°C. El lisado bacteriano resultante tras la lisis mecánica en una French Press fue incubado con 20 µl de bolitas de Glutathione Sepharose (GE Healthcare) 1 hora a 4°C para atrapar la proteína de fusión y lavado cinco veces con PBS frío para eliminar los posibles contaminantes bacterianos. A continuación, las bolitas unidas a la GST-RalGDS-RBD fueron incubadas toda la noche a 4°C con 500 µg de lisado celular preparado según las indicaciones para western blot, a partir de células diferenciadas previamente y mantenidas en condiciones de ayuno durante 4 horas, activadas a distintos tiempos (0, 1, 5 y 15 minutos) con diferentes estímulos: 100 nM de fMLP, 3 µg/ml de LPS, así como con un reactivo denominado 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, que funciona como un análogo del AMPc capaz de activar específicamente a la GEF de Rap1 Epac (100 µM, BioLog), tras lo que volvieron a lavarse tres veces con PBS frío. Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas por western blot con el anticuerpo anti-Rap1, usando como control de la cantidad total de Rap1 disponible para el pull-down, 60 µg de los lisados celulares iniciales.

5.3. PCR cuantitativa en tiempo real

La expresión génica de RIAM en macrófagos interferidos con los vectores lentivirales pRL3.7 shControl o shRIAM, en cada caso, fue analizado mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando la sonda específica para el gen APBB1IP (RIAM) de Applied Biosystems.

El ensayo y posterior análisis de los resultados obtenidos fueron realizados íntegramente por la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (c/Faraday 7, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid), expresándose en el siguiente trabajo como la media del porcentaje relativo de transcritos de RNA mensajero presentes en cada línea celular (valor RQ) en relación a su porcentaje de transducción, obtenida de la realización de tres experimentos independientes.

6. ENSAYOS FUNCIONALES

6.1. Adhesión a fibrinógeno soluble (Ensayos realizados en colaboración con los estudiantes Javier Merino Gracia y Begoña Alday Parejo)

Se usaron como estímulos activadores de la adhesión el fMLP, el LPS, el Mn^{2+} y el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, que se incubaron con las células, previamente diferenciadas, 30 minutos a 37°C a las concentraciones ya indicadas. Después de la activación, se incubaron las células con 50 µg de fibrinógeno soluble conjugado con AlexaFluor®-647 (Invitrogen) en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Grenier) durante 30 minutos a 37°C, tras lo que se lavaron tres veces con PBS frío para retirar el fibrinógeno no unido, centrifugando cada vez la placa para retener las células a 1200 rpm 5 minutos a 4°C. Los datos finales de fluorescencia fueron recogidos con el citómetro y analizados con el programa de análisis FlowJo.

Los resultados fueron representados como los datos de unión a fibrinógeno para cada uno de los estímulos sobre el blanco proporcionado por la ausencia de fibrinógeno.

6.2. Ensayos de opsonización y fagocitosis

La opsonización de eritrocitos con el complemento se preparó siguiendo protocolos ya descritos (Olazabal et al, 2002). Brevemente, eritrocitos frescos de carnero (Oxoid, Termofisher) fueron marcados con 2 µM del reactivo DDAO-AM (Molecular Probes, Invitrogen) e incubados con concentraciones subaglutinadoras de IgM de conejo anti-eritrocitos (Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La IgM no unida fue lavada con un tampón PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (MidiMed) suplementado con un 20 mM de D-Glucosa (SIGMA) e incubadas con un 10% de suero humano deficiente en C5 (SIGMA) durante 30 minutos a 37°C. Los eritrocitos fueron lavados una vez más con el tampón de PBS

suplementado con glucosa y usados para el ensayo de fagocitosis. En el caso de la fagocitosis mediada por IgG, se siguió un protocolo semejante de opsonización al del complemento, pero sustituyendo la incubación con IgM seguida de suero humano deficiente en C5 por una de incubación con concentraciones subaglutinadoras de IgG de conejo anti-eritrocitos (Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY).

Para el ensayo fagocítico, las células previamente diferenciadas, o los MDMs en su caso, fueron tratadas o no con los diferentes estímulos ya indicados (fMLP, LPS y 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP) durante 30 minutos a 37°C. Después de ello, se las incubó a un ratio de 1:10 con los eritrocitos opsonizados con el complemento usando como control negativo eritrocitos no opsonizados durante 30 minutos a 37°C. Los eritrocitos no unidos fueron lavados tres veces con PBS frío. Alternativamente, tras la fagocitosis, las células fueron sometidas o no a un choque hipotónico con agua destilada durante 15 segundos, seguido de la adición de PBS dos veces concentrado para restaurar la osmolaridad, como forma de eliminar los eritrocitos unidos pero no los fagocitados, y medida la fluorescencia resultante emitida por los eritrocitos marcados con el DDAO-AM en el citómetro ($\lambda=647$).

Los datos fueron expresados como porcentaje de asociación (%A) o porcentaje de fagocitosis (%P), entendiéndose éstos como el porcentaje de células con uno o más eritrocitos unidos y fagocitados o sólo fagocitados, respectivamente, obteniéndose el último a partir de los resultados arrojados por las células tratadas con el choque osmótico. También se usó como forma de expresión el índice de asociación (IA) y el índice de fagocitosis (IP), que representan el número de eritrocitos unidos y fagocitados o sólo fagocitados por cada 100 fagocitos analizados, respectivamente. Estos índices fueron calculados multiplicando el porcentaje de células que unen e internalizan o sólo internalizan los eritrocitos marcados, por el la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células positivas para el marcaje (Pricop et al, 1997).

6.3. Inmunocitoquímica

Para poder observar *in situ* la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con complemento, se sembraron 250000 células/pocillo sobre cámaras de inmunocitoquímica (*Lab-Tek II Chamber slides*, Nunc), donde se llevo a cabo la diferenciación. Una vez diferenciadas las células, se mantuvieron en condiciones de ayuno durante 4 horas, transcurridas las cuales fueron estimuladas o no con 100 μ M de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP durante 30 minutos a 37°C. Después de la estimulación, se las incubó a un ratio de 1:32 con los eritrocitos opsonizados con el complemento, usando como control negativo eritrocitos no opsonizados, durante 1 hora a 37°C, tras lo que se procedió a su fijación con un 4% de Paraformaldehído (SIGMA) disuelto en una solución de 20 mM Tris-HCl, 10 mM EGTA, 0,12 M Sacarosa y 2 mM $MgCl_2$ pH 7.3, en la que se emplearon 20 minutos a temperatura ambiente.

Una vez fijadas las células, se las lavo tres veces con PBS para después proceder a su permeabilización, para la que se incubaron dos minutos con 0,1% de Tritón X-100 en TBS. Antes de empezar con las tinciones inmunocitoquímicas se realizó un bloqueo de los receptores de Fc de 30 minutos a 4°C con 100 µg/ml de γ -Globulina humana en TBS con un 10% FBS, tras la cual se añadió el anticuerpo primario, en este caso una IgG de conejo anti-eritrocitos a dilución 1:500 en la misma solución anterior de bloqueo (100 µg/ml γ -Globulina, TBS 10% FBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para retirar el exceso de IgG no unida se realizaron tres lavados con TBS y se procedió a añadir un anti-conejo AlexaFluor®-555 (Invitrogen), de nuevo usando la solución de γ -Globulina TBS 10% FBS, a una dilución 1:500, que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar se lavó una vez más con TBS tres veces y se desmontaron las cámaras para dejar los portaobjetos al descubierto y poder poner los cubres ayudándose para ello de una gota de medio de montaje Fluoro-gel® de Electron Microscopy Sciences.

El resultado de la inmunocitoquímica se analizó con ayuda de un microscopio de fluorescencia AXIO Imager.A1 (Zeiss), usando las emisiones de verde y rojo proporcionadas por el GFP de las células y el anticuerpo secundario frente a los eritrocitos, respectivamente, y se montaron con ayuda del software adaptado al programa de captación fotográfica AxioVision 4.6.3. Se contaron 15 campos distintos al azar para cada línea celular, en cada uno de los cuales se contaron el número total de células verdes y el número total de eritrocitos ligados y/o fagocitados, cuya relación, expresada por cada 100 células transducidas nos daría el índice fagocítico del experimento.

6.4. Microscopía confocal

Para comprobar el efecto de RIAM sobre la translocación de talina a la copa fagocítica, 1×10^6 células diferenciadas hacia la estirpe granulocítica fueron incubadas con eritrocitos opsonizados con complemento, como se ha relatado con anterioridad para los ensayos de opsonofagocitosis, durante 15 minutos a 37°C, realizándose la fijación al mismo tiempo con un 4% de Paraformaldehído en la misma solución indicada para la inmunocitoquímica. Posteriormente, se sembraron en portaobjetos recubiertos de poli-Lisina (SIGMA) y se permeabilizaron 2 minutos con 0,1% de Tritón X-100 en TBS.

Del mismo modo que antes, se bloquearon los receptores de Fc de 30 minutos a 4°C con 100 µg/ml de γ -Globulina humana en TBS con un 10% FBS para añadir después los anticuerpos primarios, en este caso un anti-Talina (SIGMA) a dilución 1:500 y una igG anti-eritrocitos (Chemical & Scientific Corporation, Westbury, NY) a dilución 1:500, en la misma solución de bloqueo (100 µg/ml γ -Globulina, TBS 10% FBS), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios no unidos se retiraron lavando tres veces con TBS, tras lo cual se añadieron los secundarios, un anti-ratón conjugado con Alexa-647 (Invitrogen) a dilución 1:500

y un anti-conejo acoplado a Alexa-555 (Invitrogen) a dilución 1:500, de nuevo en la solución de γ -Globulina TBS 10% FBS, que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar se lavó una vez más con TBS tres veces y se colocaron los cubres, con ayuda de una gota de medio de montaje Fluoro-gel® de Electron Microscopy Sciences.

La recogida de resultados se realizó con el microscopio de barrido láser confocal LSM510 META, acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss), situado en el servicio de microscopía confocal del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CBM-SO (c/Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid), tomándose imágenes de cinco campos independientes para cada línea y realizándose las tomas en seis planos focales para cada campo. Posteriormente el canal de color correspondiente al anticuerpo conjugado con Alexa-647 fue transformado en verde al procesar la imagen para mejorar su calidad usando Adobe Photoshop Images y la colocación de los pixels fue analizada con el software libre de análisis de imagen Fiji (www.fiji.sc).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las muestras fueron analizadas estadísticamente usando la T de student, mientras que los errores muestrales fueron representados usando el parámetro estadístico SEM, que refleja la desviación media estándar de las muestras estimadas en una población media, y que puede obtenerse mediante la desviación estándar de la población, dividida por la raíz cuadrada del volumen de muestras, asumiendo la independencia estadística de los valores en la muestra.

La significancia estadística fue determinada con ayuda de la herramienta web situada en la página <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html> para muestras independientes, y expresada como $p < 0,05$ o $p < 0,01$ según los datos obtenidos.

RESULTADOS

1. SUPRESIÓN ESTABLE DE LA EXPRESIÓN DE RIAM EN LA LÍNEA CELULAR PROMIELOCÍTICA HUMANA HL60 DIFERENCIADA AL LINAJE GRANULOCÍTICO

Para determinar el papel de la proteína adaptadora RIAM en la ruta de señalización que conduce a la fagocitosis de partículas opsonizadas con el complemento, utilizamos como modelo de estudio la línea celular promielocítica humana HL60 (Gallagher et al, 1979). Esta línea tiene la capacidad de diferenciarse tanto al linaje granulocítico como al linaje monocítico tras adicionársele los agentes diferenciadores adecuados para cada caso. La diferenciación puede monitorizarse fácilmente por la expresión de los marcadores de diferenciación CD11b y CD11c (cadena α M de la integrina α M β 2 y cadena α X de la integrina α X β 2, respectivamente) que a la vez resultan ser los receptores de complemento objeto del estudio. Esto nos permitía usar el mismo sistema celular para ensayar el efecto de la supresión de RIAM en estirpes mieloides distintas partiendo del mismo progenitor, como método para comprobar la implicación de RIAM en un mecanismo general de activación de estos receptores durante la fagocitosis.

Decidimos comenzar el estudio con el análisis de la posible implicación de RIAM en la fagocitosis mediada por complemento en células del linaje granulocítico. A partir de la bibliografía disponible comprobamos que estaba descrito que la línea celular HL60 aumentaba la expresión de RIAM al ser diferenciada a neutrófilo con ácido retinoico (Inagaki et al, 2003), por lo que nuestro primer objetivo se centró en producir una línea celular en la que la expresión de RIAM estuviera interferida de forma estable en las células promielocíticas y que se mantuviera la supresión de dicha expresión de RIAM durante la diferenciación a la estirpe granulocítica.

Para ello se usó, en primer lugar, un sistema de silenciamiento lentiviral basado en el vector pRLL3.7, que incluye un gen reportero de tipo GFP para seleccionar las células que incorporan la construcción satisfactoriamente (Rubinson et al, 2003). Dicho vector consiste en un plásmido que expresa el shRNA para RIAM (shRIAM) y un plásmido control que expresa el shRNA para la lamellipodin de ratón (shControl), dirigido frente a una secuencia de RNA inexistente en células humanas. Este sistema había sido descrito previamente y se había utilizado con éxito para el silenciamiento de RIAM en otras líneas celulares con anterioridad (Lafuente et al, 2004). Ambos plásmidos fueron introducidos por separado mediante transducción en las células HL60, realizándose una selección de las mismas por *cell sorting* en base a la expresión de GFP para obtener una línea silenciada más pura en cuanto a la

interferencia de la proteína diana. De esta forma se obtuvo una población cuyo silenciamiento se analizó por western blot tanto en células HL60 sin diferenciar como en células diferenciadas con 1 μ M de ácido retinoico durante 4 días (**Figura 1**, panel **A**), siendo calculada la reducción inicial de la expresión de RIAM mediante densitometría de las bandas como en un 88% respecto a la expresión en las células control basales, y disminuyendo hasta alcanzar un 71% de interferencia durante la diferenciación a la estirpe granulocítica (**Figura 1**, panel **B**). Tal y como estaba descrito, la expresión de RIAM aumentó durante la diferenciación a granulocito tanto en el control como en las células transducidas con el shRIAM, siempre manteniéndose la interferencia. También aumentó la expresión de los marcadores CD11b y CD11c, como corresponde al paso de células sin diferenciar a diferenciadas, sin que ambos marcadores parezcan afectados significativamente por la interferencia (**Figura 1**, panel **C**), llegando a alcanzar casi el doble de expresión de la proteína que en las células sin diferenciar.

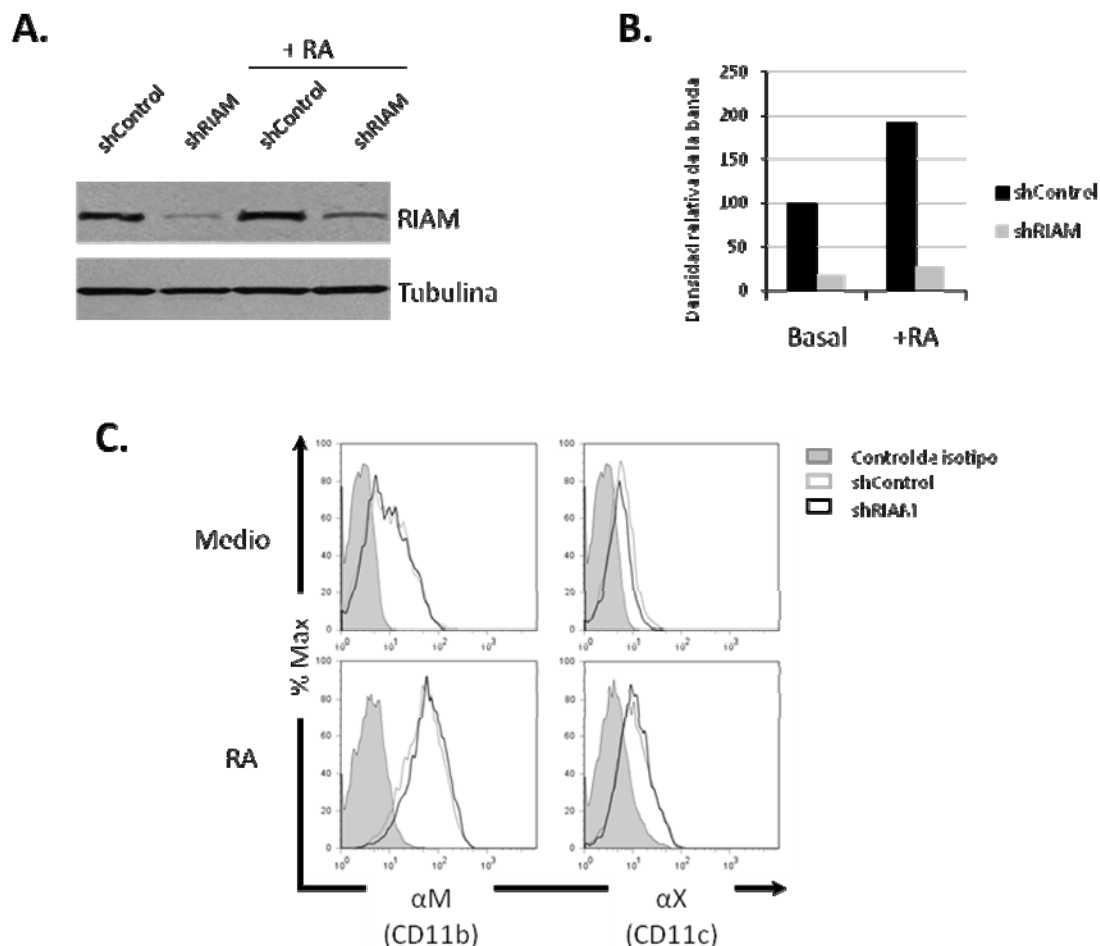


Figura 1: (A) Supresión de la expresión de RIAM en las células HL60 con los vectores lentivirales pRLL3.7 shRIAM y shControl, tanto en células sin diferenciar, como en células diferenciadas con 1 μ M de ácido retinoico (RA) durante 4 días. (B) Cuantificación por densitometría de la interferencia de RIAM. La estimulación de la expresión de RIAM con la diferenciación puede observarse en la muestra shControl diferenciada con RA, donde la expresión de la proteína aumenta hasta un 90%. (C) La expresión de los marcadores de diferenciación CD11b y CD11c asegura que efectivamente la diferenciación se está produciendo, no observándose cambios significativos entre las dos líneas celulares. RA = Ácido retinoico.

En segundo lugar, y como método para validar los resultados funcionales que se iban obteniendo con esta primera línea con la expresión de RIAM interferida, se produjo una segunda línea celular HL60 en el que la supresión de la expresión de RIAM fue conseguida con un vector distinto, de tipo retroviral, que contenía una secuencia interferente de RIAM diferente a la usada en el sistema lentiviral (**Figura 2**), lo que permitía distinguir entre los posibles efectos causados por la propia introducción del vector lentiviral, frente a los causados en sí mismo por la interferencia. Las células fueron transducidas por separado con los vectores pRS-TR3, plásmido comercial que expresa un shRNA para la proteína GFP y que servirá como control, y el vector pRS-shRIAM99, con diana en la secuencia de RIAM, seleccionado entre cuatro plásmidos comerciales frente a RIAM por su eficiencia en el silenciamiento. Estos dos vectores permitían la selección de las células satisfactoriamente transducidas a través de la expresión de una resistencia al antibiótico puromicina. La eficiencia de la interferencia fue analizada por western blot tanto en las células indiferenciadas como después de una diferenciación con 1 μ M de ácido retinoico durante 4 días (**Figura 3**, panel **A**), alcanzando a bloquear un 70% de la expresión de la proteína en las células sin diferenciar y un 45% de de la expresión a lo largo del proceso de diferenciación a la estirpe granulocítica (**Figura 3**, panel **B**). De nuevo, se observó el aumento de la expresión de RIAM en la línea celular control con la diferenciación y el incremento en la expresión de los marcadores de diferenciación CD11b y CD11c a lo largo del proceso, sin que la interferencia afecte significativamente a la expresión de los mismos (**Figura 3**, panel **C**).

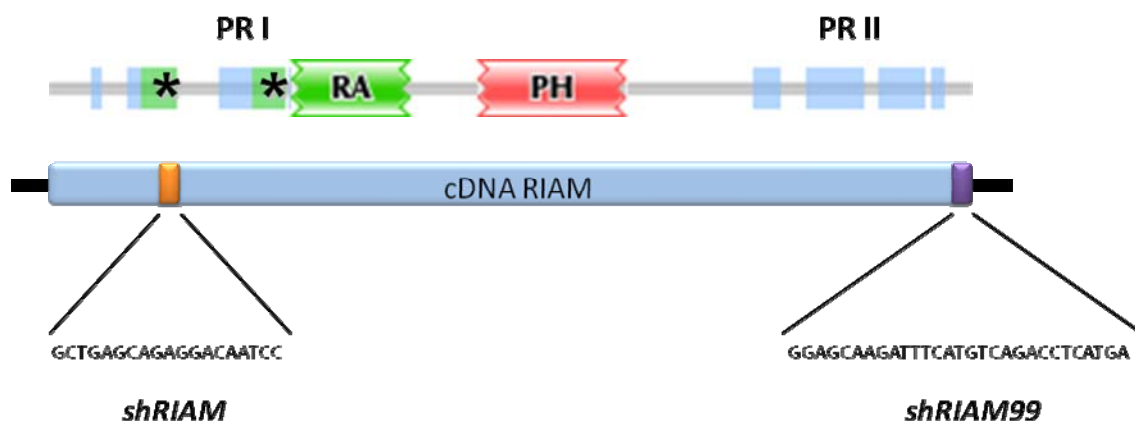


Figura 2: Posición de los dos shRNAs utilizados para suprimir la expresión de RIAM. El shRIAM lentiviral aparece dentro de la región del cDNA que codifica para el primer dominio coiled-coil de RIAM, mientras que el shRIAM99 retroviral lo hace en el cDNA situado justamente detrás de la región rica en prolina situada más cerca del C-terminal. PR = Dominio rico en Prolinas; RA = Dominio de asociación a Ras; PH = Dominio de homología a plekstrina

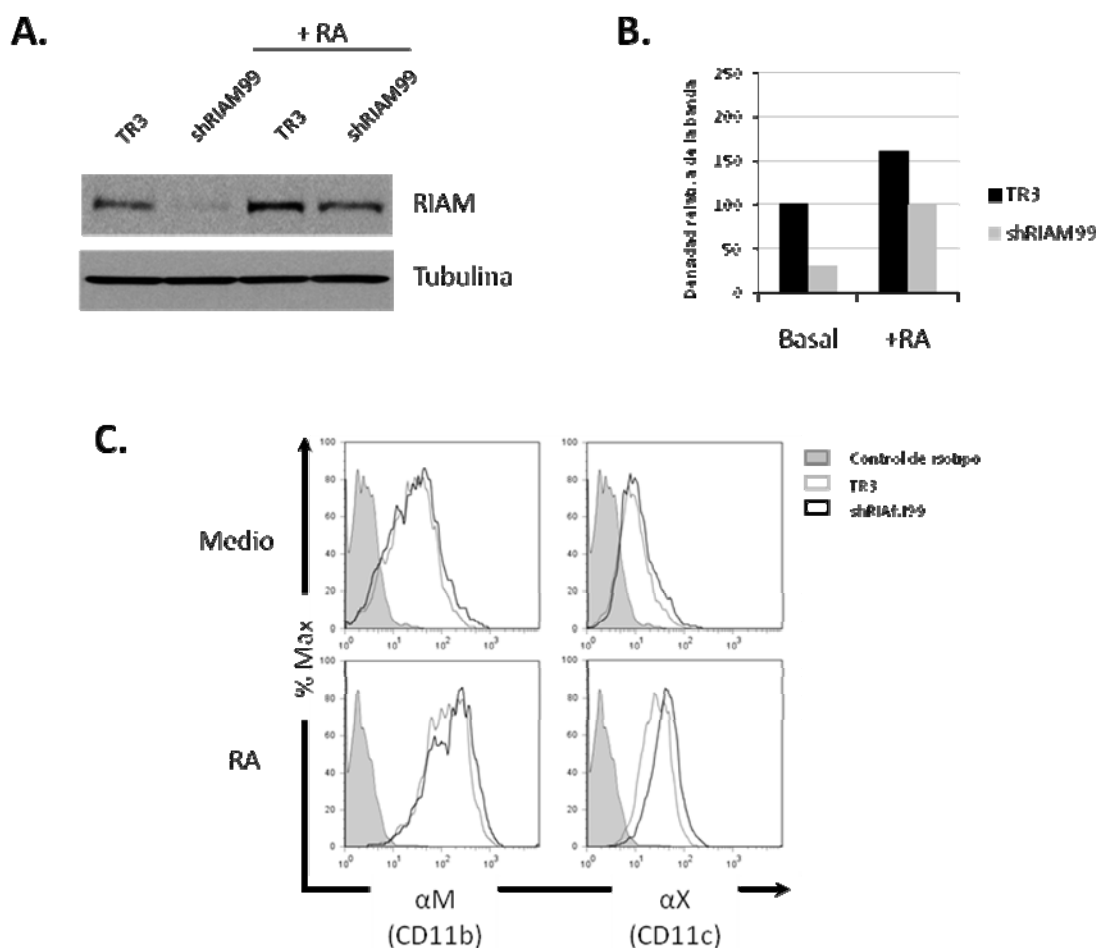


Figura 3: (A) Supresión de la expresión de RIAM en las células HL60 con los vectores retrovirales pRS-shRIAM99 y pRS-TR3, tanto en células sin diferenciar, como en células diferenciadas con 1 μ M de ácido retinoico (RA) durante 4 días. (B) Cuantificación por densitometría de la supresión. Como en el caso anterior, se observa el aumento de la expresión de RIAM con la diferenciación en la muestra TR3 diferenciada con RA donde la expresión de la proteína alcanza un 45% más que en las células sin diferenciar. (C) De nuevo, la expresión de los marcadores de diferenciación CD11b y CD11c asegura que se produce la diferenciación, no apareciendo diferencias sustanciales de expresión respecto a las dos líneas celulares analizadas. RA = Ácido retinoico.

2. RIAM REGULA LA ACTIVACIÓN DE LA INTEGRINA α M β 2 EN RESPUESTA A ESTÍMULOS ACTIVADORES DE LA FAGOCITOSIS

La fagocitosis mediada por los receptores del complemento, como otros procesos de tipo adhesivo dependientes de integrinas, es un evento desencadenado en último caso por cambios en la conformación de estas moléculas que resultan en su activación e incrementan su afinidad por la unión a ligando. Estos cambios conformacionales pueden ser detectados

mediante el uso de anticuerpos monoclonales que reconozcan específicamente dominios expuestos tras la activación que no aparecen en la integrina en reposo (Diamond et al, 1993), y que se asocian con este aumento de afinidad (Lomakina et al, 2004; Woska et al, 1998).

Nosotros hemos utilizado el anticuerpo sensor de la activación CBRM1/5 (Oxvig et al, 1999) para analizar los posibles efectos que pudiera tener la ausencia de expresión de RIAM sobre la afinidad del receptor del complemento CR3/ α M β 2 cuando se estimulan las células con activadores conocidos de fagocitosis, como son el fMLP, un péptido sintético cuya acción es análoga a la de péptidos con grupos metionina formilados en el N-terminal presentes en bacterias, o el LPS, una molécula que se encuentra en la membrana externa de las bacterias gram-negativas.

La **Figura 4**, en su panel **A**, muestra los cambios en la capacidad media de unión del CBRM1/5 a las células HL60, diferenciadas con 1 μ M de ácido retinoico durante 4 días, tras una estimulación de 30 minutos con 100 nM de fMLP o con 3 μ g/ml de LPS, en un experimento representativo, usando como control las células sin estimular. Algunos agentes activadores de la adhesión mediada por α M β 2, como el fMLP, producen la sobreexpresión de integrinas en la superficie celular (Kishimoto et al, 1989), por lo que para asegurar que el aumento de la unión de CBRM1/5 no se debía a cambios en la expresión de las integrinas durante el experimento, analizamos en paralelo la unión del anticuerpo Bear-1, ya que éste es capaz de unirse a la cadena α M de la integrina α M β 2 tanto en su forma en reposo como en su forma activada. La expresión de la integrina α M β 2 no presentó variaciones entre las células transducidas con el shControl y las células con la expresión de RIAM interferida, ni siquiera tras la estimulación con los distintos agentes, por lo que concluimos que los cambios observados en la unión a CBRM1/5 debían representar cambios en la activación de las moléculas de α M β 2 ya presentes en la superficie celular.

En cambio, la comparación entre el número de moléculas de integrina totales presentes frente al número de moléculas activadas nos revela que la interferencia de RIAM produce una variación en la capacidad de activación de la integrina para todos los estímulos ensayados, reduciéndose la unión del CBRM1/5 en un 50% o más, dependiendo del estímulo, en las células transducidas con el shRIAM. Esto indicaría que la interferencia de RIAM tiene un profundo efecto sobre la activación de la integrina α M β 2 mediada por estos estímulos, sin que pueda achacarse la reducción en la afinidad a diferencias en cuanto a la expresión de la misma en la superficie celular. Tanto el fMLP como el LPS a las concentraciones ensayadas mostraron que son capaces de activar a Rap1 cuando se estimula las células HL60 con ellos durante 15 minutos, por lo que la vía de transducción de señales desde los receptores de estas moléculas hasta la integrina, parece estar afectada por debajo de la activación de Rap1, situando a RIAM en algún punto de la misma con un papel ciertamente esencial (**Figura 4**, panel **C**)

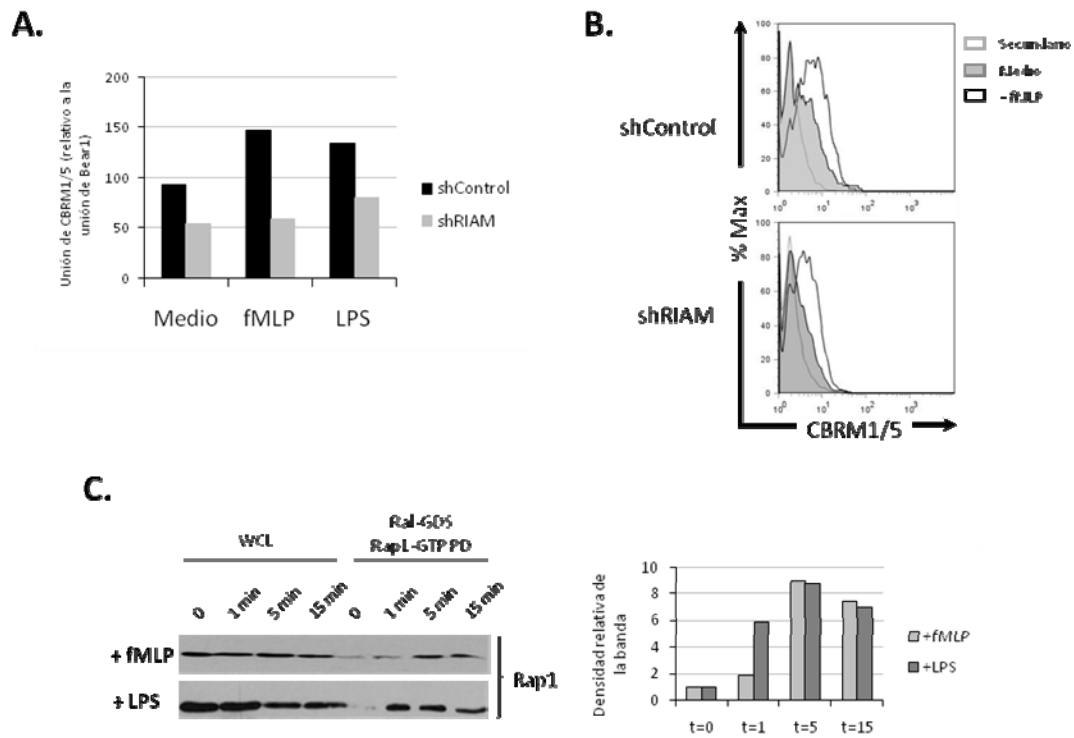


Figura 4: (A) Experimento representativo de activación de la integrina $\alpha\text{M}\beta 2$ en el que se ha relativizado la unión del anticuerpo sensor de la activación CBRM1/5 a la unión del anticuerpo sensor de la expresión Bear-1; la barra negra representa la activación de las células transducidas con el shControl, mientras que la barra gris representa la activación de las células con la expresión de RIAM interferida. La estimulación produjo aumentos en el estado de activación de la integrina $\alpha\text{M}\beta 2$ para todos los estímulos ensayados en el caso de las células control, observándose que las células con la expresión de RIAM interferida presentan una activación de $\alpha\text{M}\beta 2$ al menos reducida en un 50%. (B) Perfil de activación de citometría de flujo para el estímulo fMLP. Se aprecia que la población estimulada se desplaza respecto a la no estimulada de forma más acusada en el caso de las células control, representando el aumento de moléculas de $\alpha\text{M}\beta 2$ que sufren el cambio conformacional al activarse. (C) Pull-down realizado en las células HL60 diferenciadas al linaje granulocítico y estimuladas con 100 nM fMLP y 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS con la proteína de fusión GST-RaIGDS (RBD). El pull-down se llevó a cabo midiendo una cinética de activación de 0, 1 minuto, 5 minutos y 15 minutos, observándose un pico de activación a los cinco minutos con el fMLP y uno de comienzo en 1 minuto y caída a los cinco minutos con el LPS. WCL = Lisado celular total; PD = Pull-down.

Varios estudios han mostrado que un incremento en la unión del anticuerpo CBRM1/5 correlaciona con un incremento en la adhesión mediada por $\alpha\text{M}\beta 2$ (Oxvig et al, 1999), por lo que el siguiente paso lógico fue el comprobar si el descenso observado en la activación de las integrinas detectado en los ensayos con este anticuerpo se corresponde, efectivamente, con un descenso en la unión a ligando. Por este motivo, realizamos una serie de experimentos de adhesión con fibrinógeno soluble utilizando los estímulos activadores de la fagocitosis LPS y fMLP; elegimos hacer el ensayo con ligando soluble en lugar de utilizar el tradicional ensayo de

adhesión en placa para excluir los posibles efectos derivados de la señalización *'outside-in'* a través de la integrina (Bertoni et al, 2002; Sebzda et al, 2002; Katagiri et al, 2000).

Para ello, se diferenció tanto la línea HL60 shControl como la línea HL60 con la expresión de RIAM interferida con 1 μ M de ácido retinoico durante 4 días y ambas se estimularon 30 minutos con 100 nM de fMLP o 3 μ g/ml de LPS. Tras la estimulación, las células fueron incubadas con 50 μ g de fibrinógeno soluble conjugado con Alexa-647, lavadas y analizadas por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como la intensidad de fluorescencia obtenida en cada experimento, relativa a la unión a fibrinógeno de las células control sin estimular, tal como se aprecia en la **Figura 5**. Se observa que la adición de los estímulos es capaz de incrementar la unión de fibrinógeno principalmente en las células control, mientras que en las células con la expresión de RIAM interferida, dicho aumento es inexistente o al menos inferior al de las células sin interferir, lo que reafirmaría la hipótesis de que RIAM se encontraría mediando la afinidad de la integrina α M β 2 por sus ligandos. La significancia estadística quedó establecida como $p < 0,05$ para todos los casos siendo, reflejando la alta confianza de los datos obtenidos.

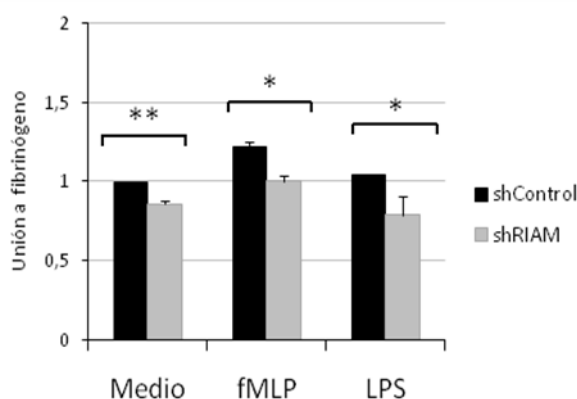
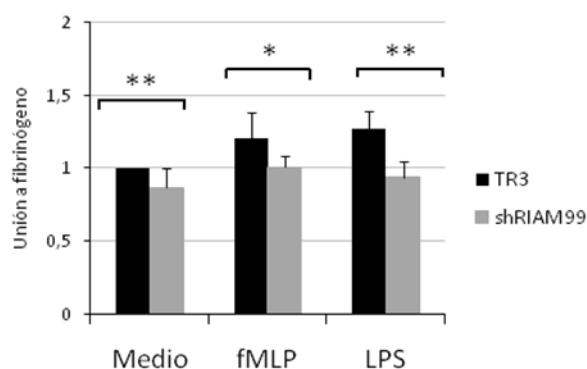


Figura 5: Unión a fibrinógeno soluble de las células HL60 shControl y shRIAM diferenciadas a la estirpe granulocítica. Las células con la expresión de RIAM interferida mostraron una menor unión a ligando tras la estimulación tanto con fMLP como con LPS, que las células control

Como medio para corroborar estos resultados, repetimos este experimento de adhesión a fibrinógeno soluble utilizando el sistema retroviral HL60 TR3 y HL60 shRIAM99 diferenciado con 1 μ M de ácido retinoico durante 4 días y aplicando las mismas condiciones de estimulación y la misma cantidad de fibrinógeno soluble, 50 μ g, que usamos con el sistema lentiviral. En la **Figura 6** podemos apreciar que, al igual que sucedía con las células del par shControl/shRIAM, los estímulos LPS y fMLP en este sistema fueron sólo capaces de incrementar la unión de fibrinógeno en la línea celular control TR3, mientras que la línea interferida presentaba ratios de unión inferiores en todos los casos y no respondía a la estimulación. Del mismo modo que antes, la significancia estadística siempre inferior a 0,05 otorgaba completa confianza a los datos de los experimentos.

Figura 6: Unión a fibrinógeno soluble de las células HL60 TR3 y shRIAM99 diferenciadas al linaje granulocítico. Las células con la expresión de RIAM interferida mostraron una menor unión a ligando tras la estimulación tanto con fMLP como con LPS, a pesar del incremento de unión a fibrinógeno que producen estos estímulos en las células sin interferir.



3. RIAM ES UNA PROTEÍNA ESENCIAL PARA LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR COMPLEMENTO EN CÉLULAS HL60 DIFERENCIADAS AL LINAJE GRANULOCÍTICO

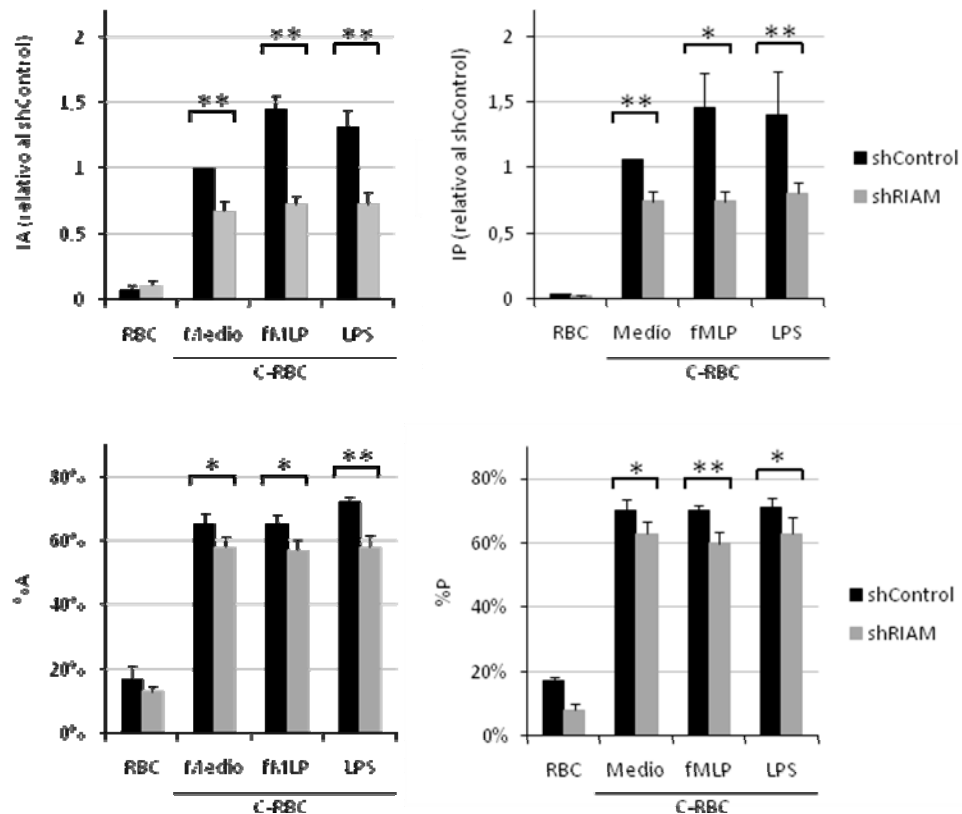
Una vez establecida la existencia de un defecto de unión de $\alpha M\beta 2$ a su ligando el fibrinógeno como consecuencia de la interferencia de RIAM, quisimos comprobar su más que probable implicación en una de las funciones más especializadas de esta integrina, la fagocitosis mediada por complemento.

El experimento se llevó a cabo utilizando eritrocitos de carnero opsonizados con complemento y teñidos con 2 μM del reactivo fluorescente rojo DDAO-AM que permite el análisis de la fagocitosis por citometría de flujo. Las líneas HL60 shControl y shRIAM se diferenciaron durante 4 días con 1 μM de ácido retinoico y se incubaron junto con los eritrocitos opsonizados con el complemento y marcados durante 30 minutos a 37°C, ensayándose tanto la fagocitosis basal como la que se produce después de estimular las células con 100 nM de fMLP o 3 $\mu g/ml$ de LPS. Como control se utilizó la fagocitosis de eritrocitos marcados pero no opsonizados.

Para poder discernir entre partículas ingeridas y partículas unidas a las células, sometimos a la reacción de fagocitosis a un breve choque hipotónico, que nos permitió lisar los eritrocitos asociados a las células pero no ingeridos. La medida de las células con eritrocitos unidos y fagocitados nos permite, de esta forma, discriminar entre la unión de la partícula y su ingesta.

De este modo, los datos se expresaron bajo el parámetro índice de asociación (IA), representando éste el número de eritrocitos unidos y fagocitados por cada 100 células fagocíticas activas, y bajo el parámetro índice de fagocitosis (IP), que representa al número de eritrocitos que se internalizan por cada 100 células fagocíticas activas (**Figura 7**, panel **A**),

A.



B.

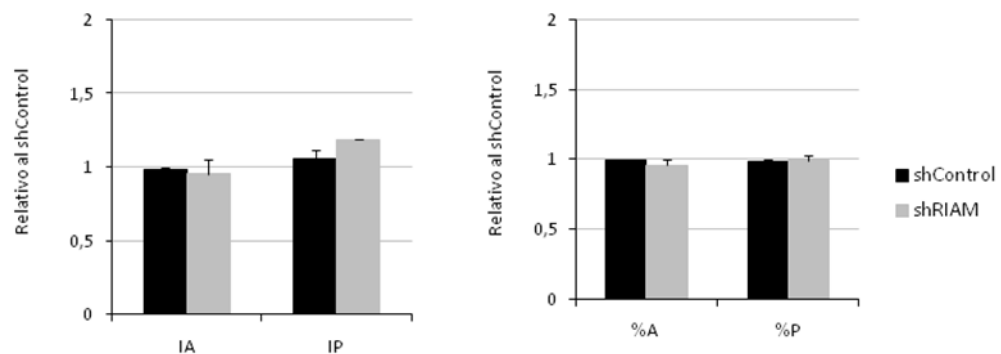


Figura 7: (A) Representación del índice de asociación (IA, gráfica superior izquierda), del índice de fagocitosis (IP, gráfica superior derecha), del porcentaje de asociación (%A, gráfica inferior izquierda), y del porcentaje de fagocitosis (%P, gráfica inferior derecha). Los datos de la IA y de la IP fueron relativizados a los resultados de las células shControl sin estimular. (B) Representación de la media de tres experimentos independientes de fagocitosis mediada por Fc. Los resultados para los cuatro parámetros analizados fueron representados relativizados a los datos obtenidos para las células shControl. RBC = Eritrocitos sin opsonizar; C-RBC = Eritrocitos opsonizados con complemento.

siendo ambos derivados de su media de intensidad de fluorescencia por el porcentaje de células que se encuentran asociando e internalizando o sólo internalizando, respectivamente.

En los resultados obtenidos podemos observar que aunque las células presentan cierta actividad fagocítica basal, el tratamiento con los estímulos utilizados produce un aumento en la cantidad de eritrocitos que las células control son capaces de unir y/o fagocitar. En cambio, en las células con la expresión de RIAM interferida, no sólo es menor la fagocitosis en la célula en estado basal, sino que el aumento en el proceso que debería producirse con la estimulación es inexistente. Al no observarse diferencias significativas entre el índice de asociación y el índice de fagocitosis, nuestros resultados parecen indicar que el defecto en la fagocitosis que se observa en las células shRIAM no se encuentra a nivel de internalización de la partícula, sino en su unión al receptor. Esto indicaría, una vez más, que RIAM se encuentra en la vía de señalización *'inside-out'* que conduce a la activación del receptor fagocítico.

También representamos el porcentaje de asociación (%A) y el porcentaje de fagocitosis (%P), entendiéndose éstos como el porcentaje de células con uno o más eritrocitos unidos y fagocitados o sólo fagocitados, respectivamente. El uso de estímulos activadores de la fagocitosis no tuvo efecto, o lo tuvo muy leve, sobre la cantidad efectiva de células que se encuentran realizando la fagocitosis, lo que indica que la respuesta a la estimulación obtenida para las células control se relaciona con un aumento de la propia capacidad de las células para el proceso y no con un aumento en su número. En todas las situaciones, el número de células que se encontraba fagocitando era entre un 5 y un 10% menor para las células con la expresión de RIAM interferida frente a las células control, tanto a nivel de asociación e ingestión de las partículas como a nivel de sólo ingestión.

Para comprobar si este efecto de la interferencia de RIAM es aplicable a otros tipos de fagocitosis, realizamos tres experimentos independientes de fagocitosis dependiente de Fc, en el que los eritrocitos marcados fueron opsonizados con IgG (**Figura 7**, panel **B**). Los datos obtenidos apuntan a que la ausencia de RIAM no produce diferencias significativas en este tipo de fagocitosis, siendo su efecto específico de la fagocitosis mediada por complemento en estas células.

Para corroborar nuestros resultados y al igual que hicimos con los experimentos de unión a fibrinógeno soluble, utilizamos las líneas celulares TR3 y shRIAM99 también diferenciadas con 1 μ M de ácido retinoico durante 4 días. La fagocitosis se realizó siguiendo las mismas condiciones que en los experimentos con las células del par lentiviral y los datos se analizaron usando los mismos parámetros. El resultado fue ligeramente distinto, probablemente porque las líneas no presentaban el mismo nivel de interferencia, ya que las células HL60 shRIAM99 diferenciadas al linaje granulocítico sólo presentan un 45% de interferencia respecto su control TR3 diferenciado (**Figura 2**, panel **B**).

En este caso, aunque los parámetros IA e IP reflejaban la misma disminución en la capacidad para asociar y/o internalizar los eritrocitos opsonizados con el complemento insensible a

agentes estimuladores de la fagocitosis, no había ninguna variación en los porcentajes de asociación y fagocitosis entre las dos líneas, sugiriendo que la cantidad de RIAM disponible en estas células es suficiente para contrarrestar algunos de los efectos de la interferencia que se observaban en el par anterior (**Figura 8**).

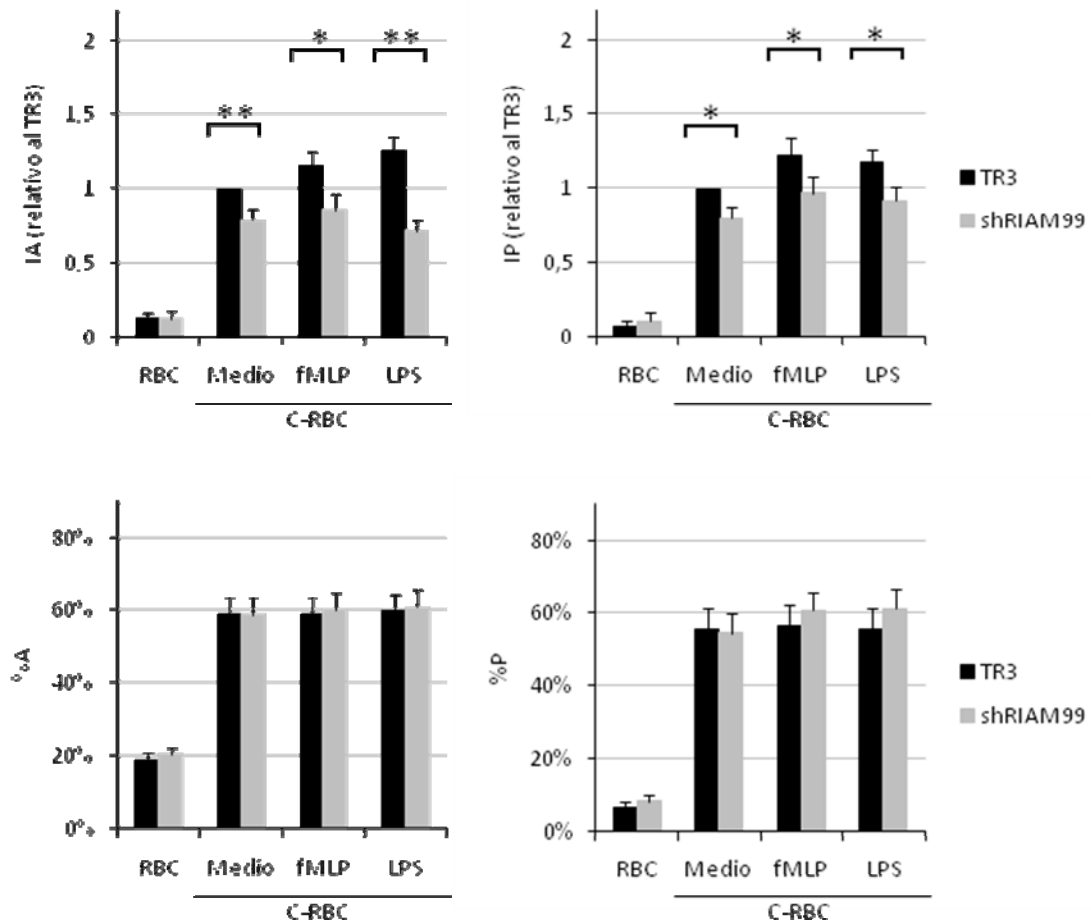


Figura 8: Representación del índice de asociación (IA, gráfica superior izquierda), del índice de fagocitosis (IP, gráfica superior derecha), del porcentaje de asociación (%A, gráfica inferior izquierda), y del porcentaje de fagocitosis (%P, gráfica inferior derecha). Los datos de la IA y de la IP fueron relativizados a los resultados de las células shControl sin estimular. RBC = Eritrocitos sin opsonizar; C-RBC = Eritrocitos opsonizados con complemento.

4. LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR COMPLEMENTO INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE RAP1 REQUIERE LA EXPRESIÓN DE RIAM EN CÉLULAS HL60 DIFERENCIADAS AL LINAJE GRANULOCÍTICO

El hecho de que en todos los casos las células con la expresión de RIAM interferida no respondan a estímulos conocidos que activan la fagocitosis como el fMLP o el LPS, hace pensar que el defecto en la activación de las integrinas asociado a su interferencia debe situarse en la vía de activación *'inside-out'* que va desde los receptores de reconocimiento de patrones de estas moléculas hasta la propia integrina. Rap1 ha demostrado tener un papel general en el control de la activación *'inside-out'* de las integrinas, y se ve activado por estos estímulos (**Figura 3**, panel **C**), por lo que decidimos investigar si RIAM estaba situado más abajo en la señalización de esta GTPasa hacia los receptores fagocíticos de tipo integrina, como preconiza su condición de efector de Rap1, durante el proceso de fagocitosis. Para ello utilizamos el compuesto 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8'CPT), un análogo del AMPc, que es capaz de activar específicamente a la GEF de Rap1 Epac activando, de este modo, de forma específica a Rap1 sin afectar a otras GTPasas, y por tanto, constituye un iniciador de señal óptimo para producir la activación única de las vías derivadas de Rap1.

Tal y como aparece en la **Figura 9**, en el panel **A**, la utilización de esta molécula para activar a Rap1 produce un descenso en la capacidad de unión de ligando a fibrinógeno soluble en las células con la expresión de RIAM interferida y diferenciadas al linaje granulocítico, tanto en las células HL60 shControl y shRIAM como en el par HL60 TR3/shRIAM99 como muestran los perfiles de citometría. Esta situación se ve reflejada en el análisis de la intensidad media de fluorescencia del fibrinógeno que las células son capaces de unir al ser activadas con 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (**Figura 9**, panel **B**), ya que tanto la línea shRIAM como la línea shRIAM99 no responden al estímulo tal y como sí lo hacen las líneas shControl y TR3. El hecho de que Rap1 se encuentre en su conformación activa por el efecto de la adición del 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (**Figura 9**, panel **C**), y aún así no se produzca un incremento en la unión a fibrinógeno, consecuencia de no producirse el cambio de afinidad de las integrinas, hace pensar que el efecto se debe única y exclusivamente a la ausencia total o parcial de RIAM, que se convierte así en el efector claro del proceso, al menos para la integrina $\alpha M\beta 2$.

Los experimentos de fagocitosis que se realizaron con ambas parejas de líneas celulares afianzaron la conclusión de que RIAM se encontraba mediando la activación de los receptores fagocíticos producida por Rap1. Las células diferenciadas con 1 μ M de ácido retinoico durante cuatro días se activaron durante 30 minutos con 100 μ M de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP y se incubaron 30 minutos a 37°C con eritrocitos teñidos con 2 μ M de DDAO-AM, opsonizados con complemento o no opsonizados como control, representándose de nuevo los parámetros índice de asociación, índice de fagocitosis, porcentaje de asociación y porcentaje de fagocitosis (**Figura 10**, panel **A**, para el par shControl/shRIAM, y **B**, para el par TR3/shRIAM99). En las gráficas, se puede apreciar como en los dos pares de células se produce una menor fagocitosis

de eritrocitos por parte de las células con la expresión de RIAM interferida respecto a sus controles, mientras que al igual que sucedía cuando se utilizaban el fMLP y el LPS como estímulos, sólo las células del par shControl/shRIAM presentaban además, menor porcentaje de asociación y fagocitosis, reafirmando la idea de que en las células shRIAM99 el remanente de proteína que conserva la célula permite que no se vean afectados estos parámetros.

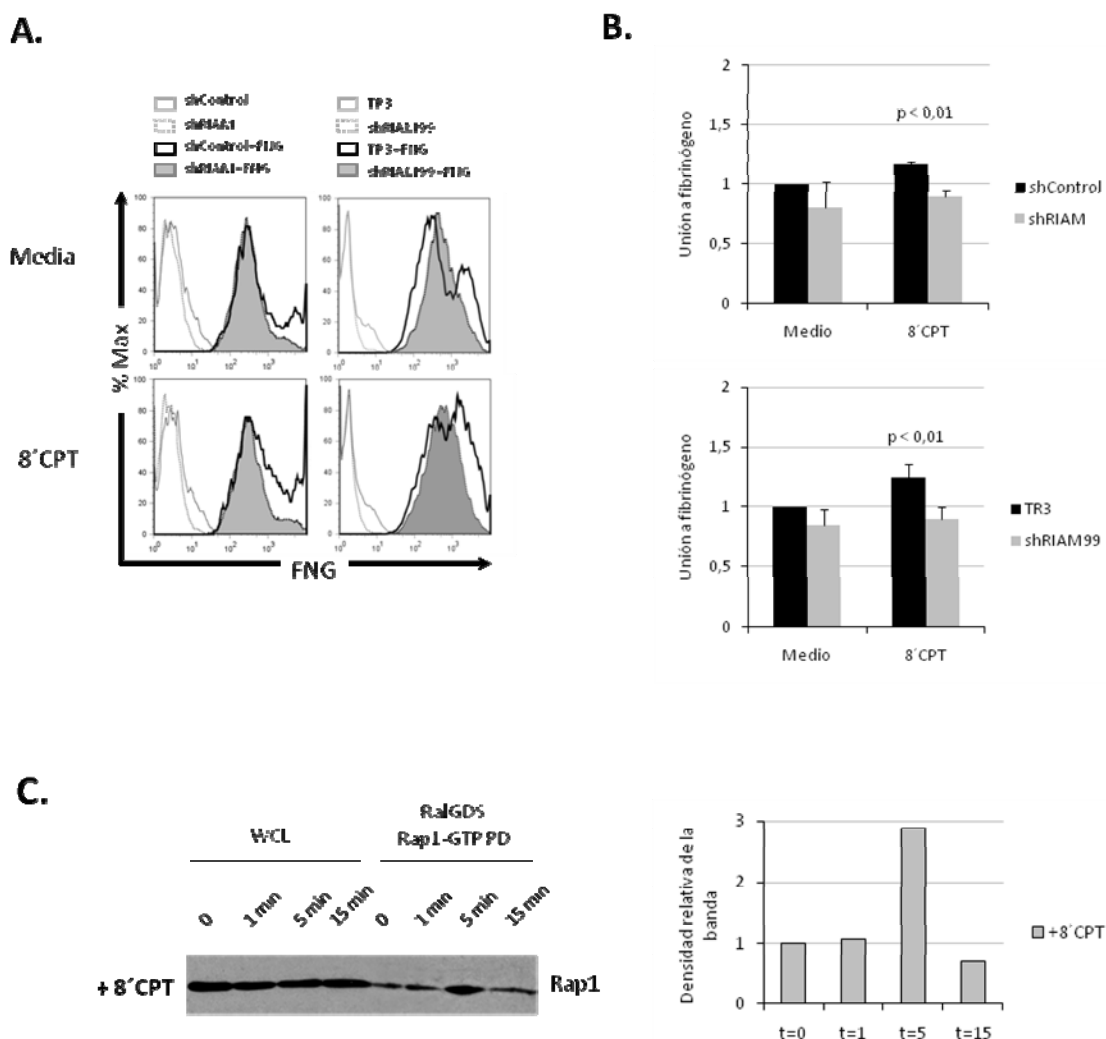


Figura 9: (A) Perfiles de citometría para la unión a fibrinógeno a las células shControl/shRIAM (perfiles a la izquierda) y a las células TR3/shRIAM99 (perfiles a la derecha), diferenciadas con ácido retinoico durante 4 días, en condiciones basales y tras la activación con 100 μ M de 8'CPT. (B) Unión a fibrinógeno soluble de las células shControl/shRIAM (gráfica superior) y de las células TR3/shRIAM99 (gráfica inferior), ambas diferenciadas al linaje granulocítico. Tanto las células shRIAM como las células shRIAM99 mostraron una menor unión a ligando tras la estimulación con 8'CPT, a pesar del incremento de unión a fibrinógeno que produce este estímulo en las células sin interferir. (C) Pull-down que muestra como tras una activación con 100 μ M del compuesto 8'CPT de células HL60 diferenciadas 4 días con 1 μ M de ácido retinoico, se produce un aumento en la cantidad de Rap1 unida a GTP situándose el máximo de activación de la GTPasa en los 5 minutos. WCL = Lisado celular total; PD = Pull-down.

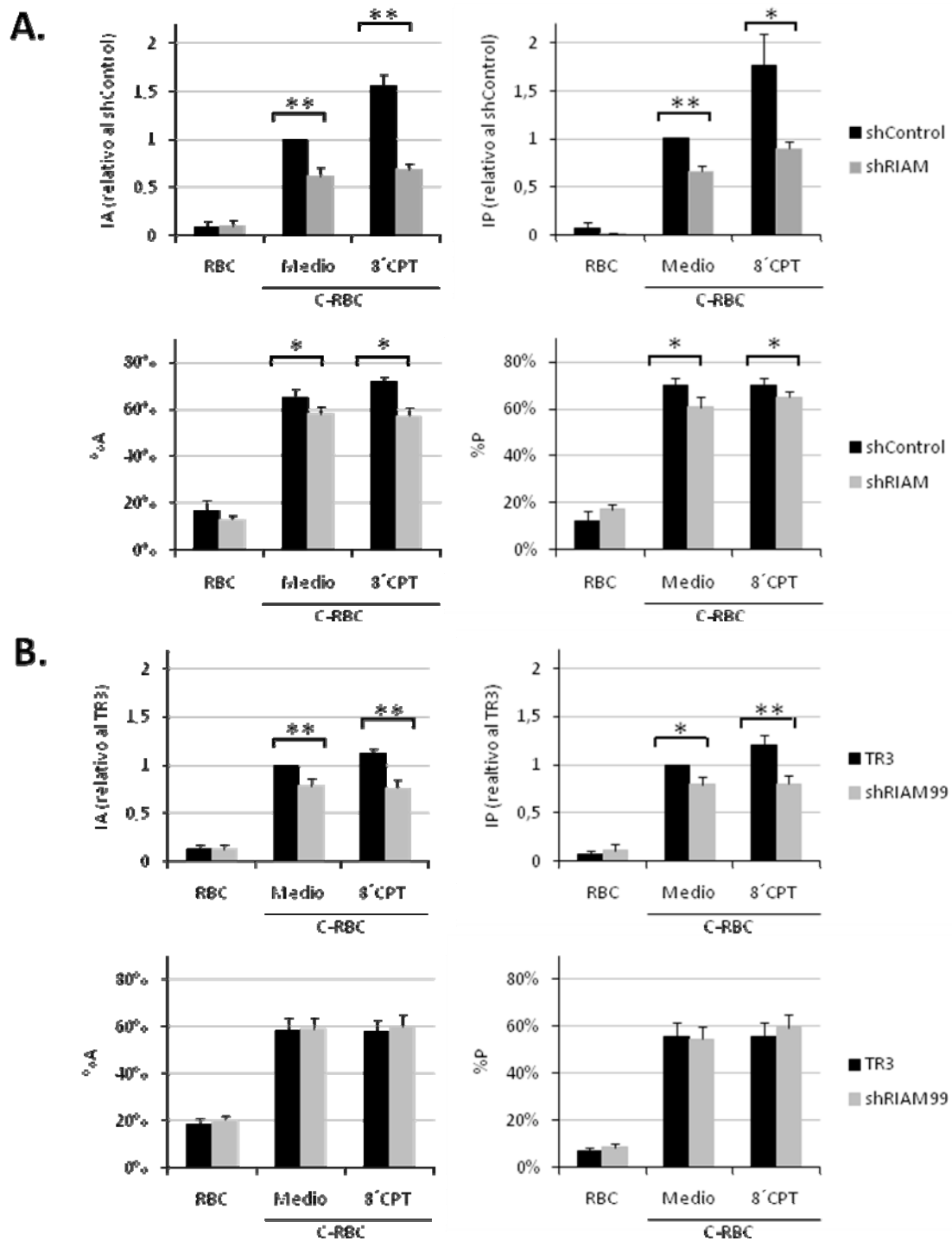


Figura 10: (A) Representación del índice de asociación (IA, gráfica superior izquierda), del índice de fagocitosis (IP, gráfica superior derecha), del porcentaje de asociación (%A, gráfica inferior izquierda), y del porcentaje de fagocitosis (%P, gráfica inferior derecha) para las células HL60 shControl y shRIAM diferenciadas 4 días con ácido retinoico. Los datos de la IA y de la IP fueron relativizados a los resultados de las células shControl sin estimular. (B) Representación del índice de asociación (IA, gráfica superior izquierda), del índice de fagocitosis (IP, gráfica superior derecha), del porcentaje de asociación (%A, gráfica inferior izquierda), y del porcentaje de fagocitosis (%P, gráfica inferior derecha) para las células HL60 TR3 y shRIAM99 diferenciadas 4 días con ácido retinoico. Los datos de la IA y de la IP fueron relativizados a los resultados de las células shControl sin estimular. RBC = Eritrocitos sin opsonizar; C-RBC = Eritrocitos opsonizados con complemento.

5. RIAM ES TAMBIÉN ESENCIAL EN LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR COMPLEMENTO EN LÍNEAS CELULARES DIFERENCIADAS A MACRÓFAGO

5.1. Línea celular HL60 diferenciada a macrófago

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que RIAM estaría formando parte de la señalización *'inside-out'* que a través de Rap1 induce la conformación activa de $\alpha M\beta 2$ y permite que esta integrina sea capaz de realizar su función fagocítica, al menos en la línea celular HL60 diferenciada hacia la estirpe granulocítica.

Para comprobar si esto sucede de la misma forma cuando las células son derivadas al linaje monocítico utilizamos las mismas líneas celulares HL60 shControl y shRIAM, pero diferenciando con 20 ng/ml de PMA durante 48 horas, tras las cuales comprobamos la diferenciación tanto por el cambio de fenotipo de las células en suspensión a uno adherente como por la expresión de los marcadores de diferenciación CD11b y CD11c. La interferencia analizada por western blot (**Figura 11**, panel **A**) y cuantificada por densitometría nos reveló un silenciamiento de la expresión de RIAM de un 87% en las células sin diferenciar y de un 65% en las células con la expresión de RIAM interferida y diferenciadas con PMA, en ambos casos expresado el porcentaje de expresión en relación a la expresión de las células control (**Figura 11**, panel **B**). La interferencia de RIAM no tiene efecto, o éste se manifiesta de forma muy ligera, sobre la expresión de los marcadores de diferenciación CD11b y CD11C (**Figura 11**, panel **C**). La diferenciación con PMA al linaje monocítico, al igual que sucedía con la diferenciación con ácido retinoico a la estirpe granulocítica, produce un aumento en la expresión de RIAM en las células shControl, en este caso de un 77% más que en las células sin diferenciar.

Para analizar el efecto que la interferencia de RIAM tiene sobre la funcionalidad de las integrinas que actúan como receptores fagocíticos cuando las células se diferencian a macrófagos, realizamos el mismo tipo de experimento de fagocitosis mediada por complemento que ya habíamos utilizado para analizar esta función en las células derivadas a granulocitos. Por tanto, diferenciamos las líneas shControl y shRIAM durante 48 horas con 20 ng/ml de PMA y las activamos o no, durante 30 minutos con 100 nM de fMLP, 3 μ g/ml de LPS o 100 μ M de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP como forma de estimular el proceso fagocítico. Una vez activadas, las células se incubaron 30 minutos con eritrocitos marcados con 2 μ M de DDAO-AM opsonizados con complemento, y se analizó el resultado por citometría de flujo, usando como control del experimento eritrocitos teñidos pero no opsonizados (**Figura 12**). De forma análoga a lo que sucedía con esta línea cuando era diferenciada a la estirpe granulocítica, la interferencia de RIAM resultó en una menor capacidad de las células para fagocitar a través del receptor del complemento y en una ausencia de respuesta a los distintos estímulos. Estas diferencias quedan de manifiesto especialmente en el primer nivel de ligación de la partícula,

como muestran los resultados obtenidos para el índice de asociación y los de porcentaje de células que se encuentran asociando e internalizando eritrocitos. Cabe resaltar que aunque en este último parámetro no se consiguen diferencias estadísticamente significativas, si que se observa una clara tendencia a que las células con la expresión de RIAM interferida sean menos capaces de realizar esta función. La diferencia entre la línea con la expresión interferida y la línea sin interferir a nivel de ingestión de la partícula también se resolvió a favor de la línea shControl, siendo las células shRIAM, del mismo modo que antes, incapaces de responder a los estímulos inductores de la fagocitosis, aunque la diferencia entre ambas es menos pronunciada, no encontrándose diferencias en el porcentaje de células capaces de internalizar entre las dos líneas.

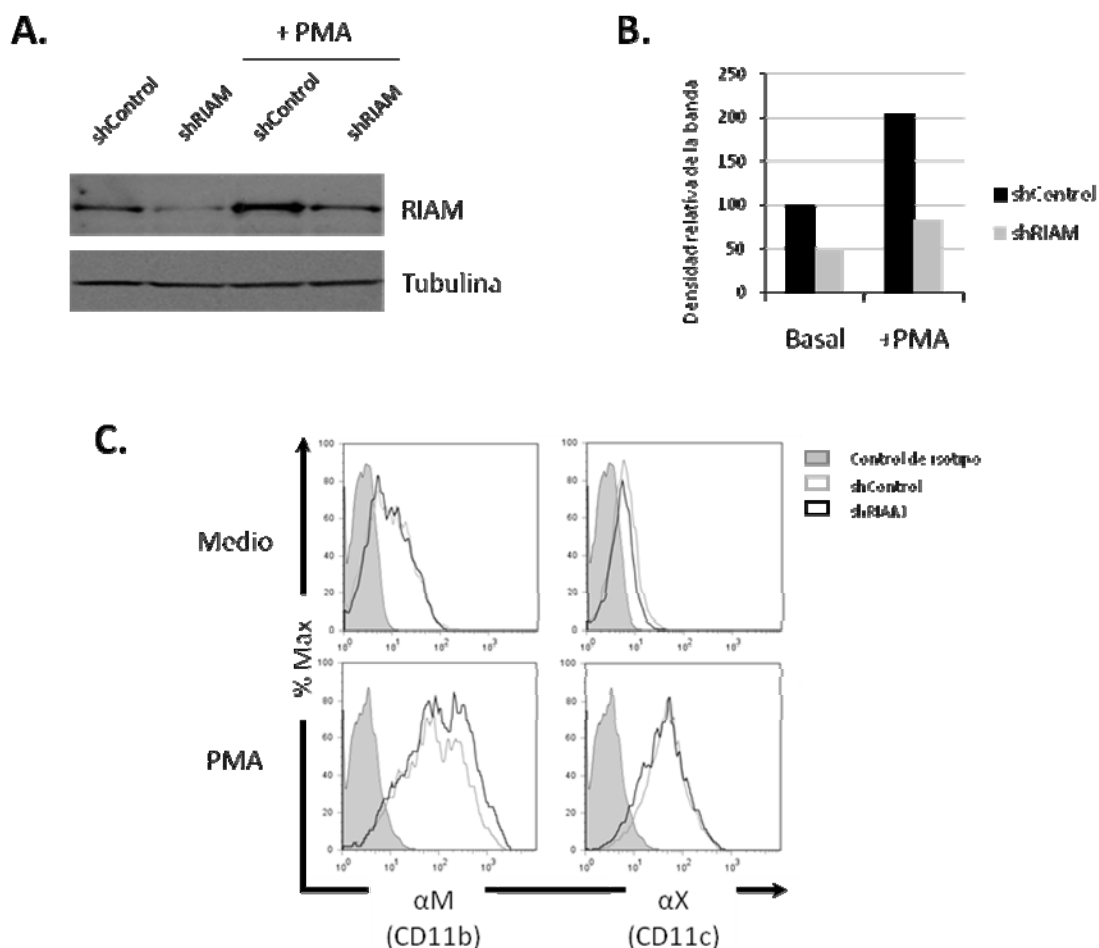


Figura 11: (A) Supresión de la expresión de RIAM en las células HL60 con los vectores lentivirales pRL3.7 shRIAM y shControl, tanto en células sin diferenciar, como en células diferenciadas con 20 ng/ml de PMA durante 48 horas. (B) Cuantificación por densitometría de la interferencia de RIAM. La expresión de RIAM aumenta con la diferenciación con PMA del mismo modo que sucedía cuando se diferenciaba con ácido retinoico. (C) La expresión de los marcadores de diferenciación CD11b y CD11c asegura que efectivamente la diferenciación se está produciendo, no observándose cambios significativos entre las dos líneas celulares.

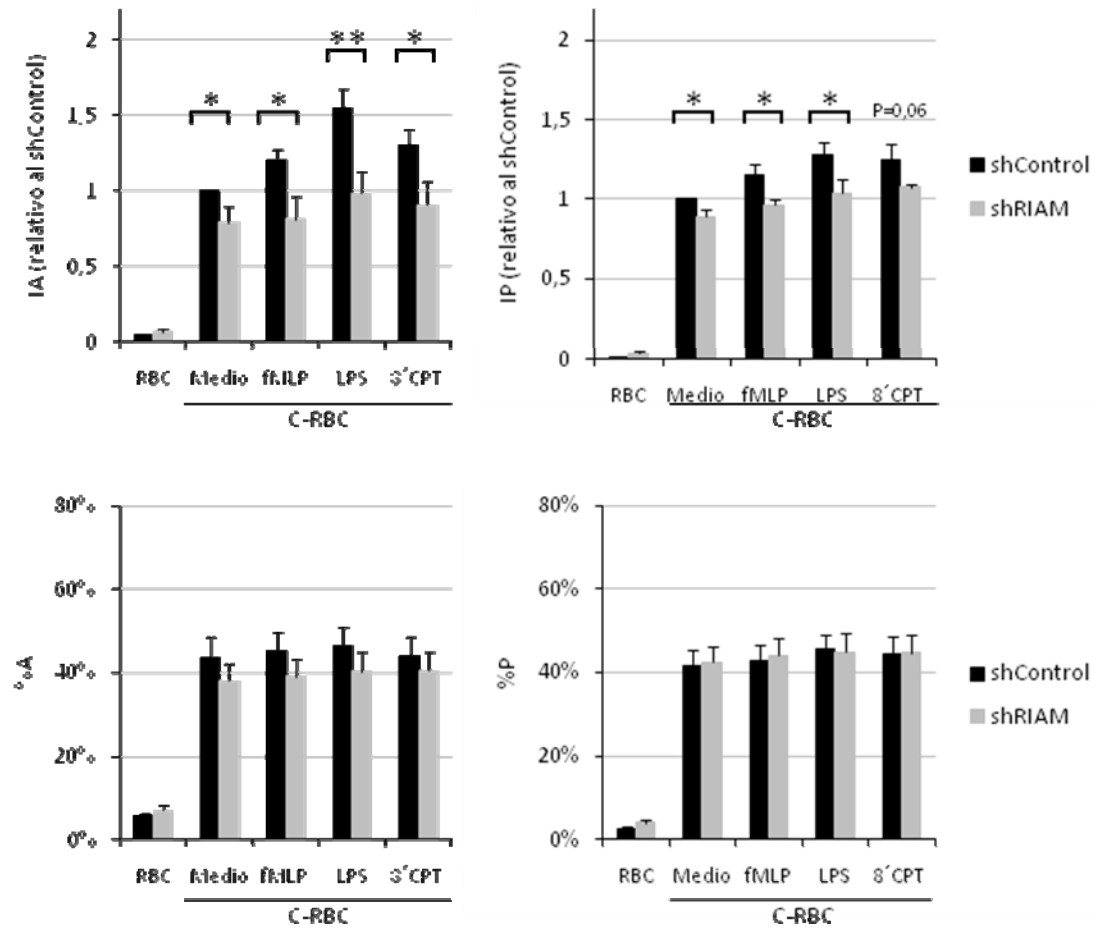


Figura 12: Representación del índice de asociación (IA, gráfica superior izquierda), del índice de fagocitosis (IP, gráfica superior derecha), del porcentaje de asociación (%A, gráfica inferior izquierda), y del porcentaje de fagocitosis (%P, gráfica inferior derecha) para las células HL60 shControl y shRIAM diferenciadas al linaje monocítico con 20 ng/ml de PMA durante 48 horas. Los datos de la IA y de la IP fueron relativizados a los resultados de las células shControl sin estimular. RBC = Eritrocitos sin opsonizar; C-RBC = Eritrocitos opsonizados con complemento.

5.2. Línea celular THP-1 diferenciada a macrófago

Como forma de confirmación de la implicación de RIAM en la fagocitosis mediada por complemento en células del linaje monocítico, utilizamos una línea celular parental distinta a las HL60, la línea THP-1 (Tsukiya et al, 1980) que retiene la capacidad para ser derivada a la estirpe monocítica tras la adición de los agentes adecuados, pero que ya no tiene la facultad de diferenciarse a la estirpe granulocítica, encontrándose en un estadio de maduración desde los progenitores mieloides más avanzado que la línea HL60. Las células THP-1 fueron transducidas con el mismo sistema lentiviral shControl y shRIAM utilizado en la línea celular HL60 y posteriormente diferenciadas con 20 ng/ml de PMA durante 48 horas, monitorizándose los marcadores CD11b y CD11c como medio para asegurar el proceso, así como observándose la variación típica en la morfología que delata el cambio al fenotipo adherente inherente al mismo. Los resultados del silenciamiento de RIAM fueron comprobados, una vez más, por

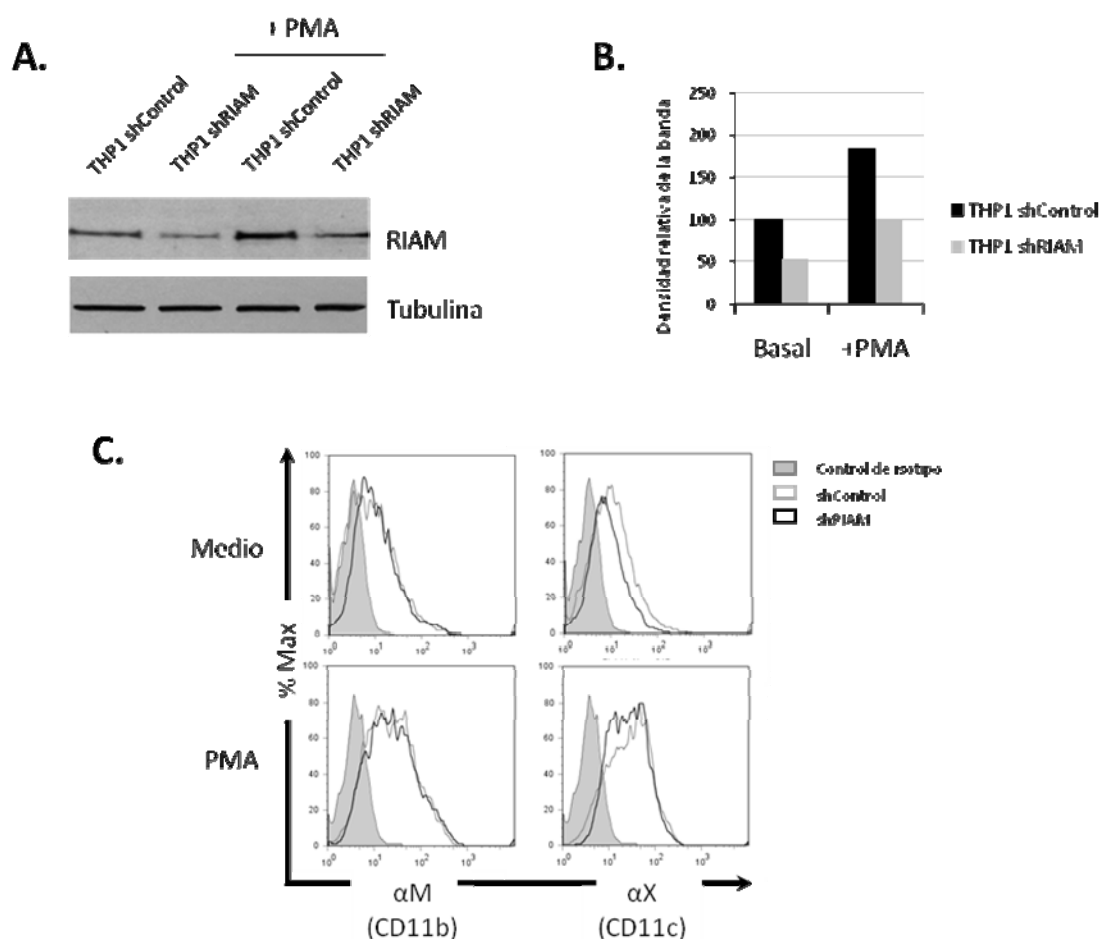
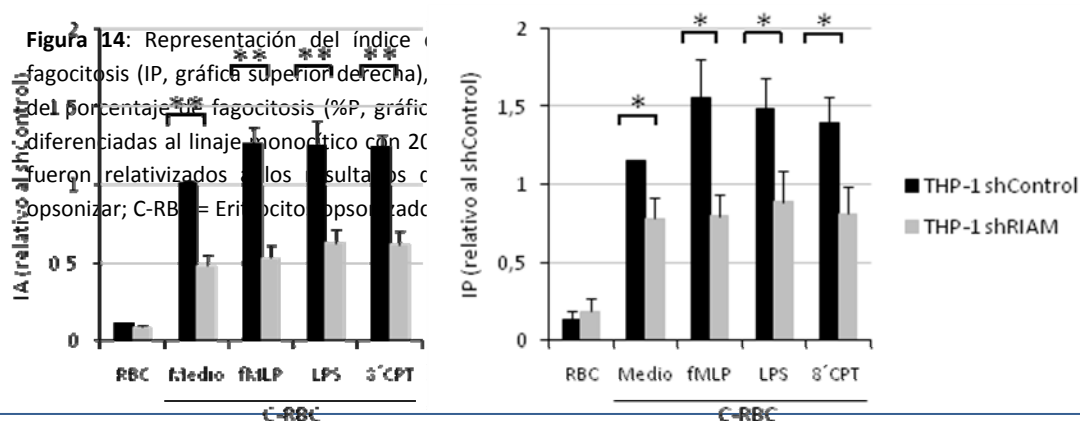


Figura 13: (A) Supresión de la expresión de RIAM en las células THP-1 con los vectores lentivirales pRL3.7 shRIAM y shControl, tanto en células sin diferenciar, como en células diferenciadas con 20 ng/ml de PMA durante 48 horas. (B) Cuantificación por densitometría de la interferencia de RIAM. Aunque la expresión de RIAM en las células interferidas y diferenciadas tiene el mismo valor que la expresión basal en las células shControl sin diferenciar, la variación en cuanto a expresión respecto al control diferenciado se mantiene gracias al aumento en la expresión de la proteína a lo largo del proceso de diferenciación con PMA. (C) La expresión de los marcadores de diferenciación CD11b y CD11c asegura que las células se están derivando a la estirpe monocítica, no observándose cambios significativos entre las dos líneas celulares.

western blot (**Figura 13**, panel **A**) y densitometrados para cuantificar dicho silenciamiento, obteniéndose que la expresión de la proteína estaba interferida un 50% en las células sin diferenciar respecto a la expresión en la línea shControl y que en las células con la expresión de RIAM interferida y diferenciadas, la expresión de la proteína era un 45% menor respecto a la línea control, también diferenciada. Al igual que en la línea celular HL60, se producía un aumento de hasta un 84% en la expresión de la proteína a lo largo del proceso de diferenciación (**Figura 13**, panel **B**). En ambos casos, células diferenciadas y sin diferenciar, la expresión de los marcadores de diferenciación no se vio afectada por la interferencia de la proteína (**Figura 13**, panel **C**).

El análisis de la capacidad fagocítica mediada por complemento en la línea THP-1 con la expresión de RIAM interferida arrojó resultados muy parecidos a los obtenidos cuando se derivaba la línea celular HL60 a la estirpe monocítica. Los experimentos se realizaron de la misma forma que se venía ensayando la fagocitosis mediada por complemento en las líneas celulares analizadas con anterioridad: se marcaron eritrocitos de carnero con 2 μ M de DDAO-AM y se opsonizaron o no con complemento, para ser incubados junto con las células THP-1 shControl y THP-1 shRIAM diferenciadas con 20 ng/ml de PMA durante 48 horas, y activadas durante 30 minutos con 100 nM de fMLP, 3 μ g/ml de LPS o 100 μ M de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP. Las células con la expresión de RIAM interferida, al igual que sucedía con las HL60, resultaron ser menos capaces de fagocitar eritrocitos que las control en estas condiciones experimentales, tal como se puede deducir de la media de los datos obtenidos para los parámetros índice de asociación e índice de fagocitosis, respectivamente (**Figura 14**, gráficas superiores). Es más, claramente puede apreciarse que las células THP-1 interferidas, así como resultaba con las células HL60 diferenciadas a macrófago, y también a granulocito, no responden a la estimulación, manteniendo todos los agentes activadores ensayados niveles similares de fagocitosis a través del complemento en cuanto a la ligación e internalización de eritrocitos que los de células sin estimular. Además, en los porcentajes de células que asocian y fagocitan (%A) o sólo fagocitan (%P), puede observarse una marcada tendencia a que éstos sean inferiores para las células con la expresión de la proteína silenciada respecto al control, aunque los datos obtenidos no son significativos (**Figura 14**, gráficas inferiores).

Además del ensayo opsonofagocítico habitual medido por citometría de flujo, decidimos realizar un experimento de fagocitosis en el que pudiéramos analizar los resultados por microscopía de fluorescencia en las líneas celulares THP-1 shControl y shRIAM. Para ello, sembramos las células en cámaras de inmunocitoquímica, que nos permitían la diferenciación



de las mismas con 20 ng/ml de PMA directamente sobre el portaobjetos del que están compuestas en su base, y su cultivo de forma estéril y aislada para cada condición durante las 48 horas que de maduración a la estirpe monocítica. Transcurrido ese tiempo y una vez que las células han alcanzado la morfología característica de macrófago se las activó o no durante 30 minutos con 100 μ M 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, como vía para activar a Rap1. Las células fueron incubadas con eritrocitos opsonizados con el complemento durante 1 hora a 37°C, utilizando eritrocitos no opsonizados como control del experimento. Al finalizar esta incubación, las células fueron fijadas con un 4% de paraformaldehído, y se procedió a la detección de los eritrocitos que habían quedado implicados en la preparación por el proceso de fagocitosis mediante el uso de un anticuerpo específico frente a los mismos. El resultado de la unión de este anticuerpo frente a eritrocitos fue revelado utilizando un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 647, que emite fluorescencia en el canal rojo lejano, contando para visualizar las células con la expresión de RIAM interferida y las controles el que éstas expresan GFP como forma de detección de la incorporación de la construcción lentiviral.

La **Figura 15**, en su panel **A**, muestra las imágenes obtenidas en un campo representativo para la línea control y otro para la línea interferida. En la línea THP-1 shControl se aprecia como las células tras ser activadas con el reactivo 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, han internalizado gran cantidad de eritrocitos, pudiendo distinguirse con facilidad los fagosomas en los que se encuentran englobados una vez han sido fagocitados. En cambio, en la línea THP-1 shRIAM estimulada con el mismo agente, aparecen sensiblemente menos eritrocitos unidos a las células y estos se encuentran casi siempre asociados, siendo vistos en el interior de células de forma muy esporádica. Las medias que arroja el índice fagocítico después de analizar 15 campos al azar en cada una de las líneas corroboran esta observación, resultando que las células shControl son capaces de fagocitar más del doble de eritrocitos que las células con la expresión de RIAM interferida cuando se activa de forma específica a Rap1 con el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (**Figura 15**, panel **B**), lo que reafirmaría el importantísimo papel de esta proteína adaptadora en la vía de activación de la fagocitosis mediada por el complemento.

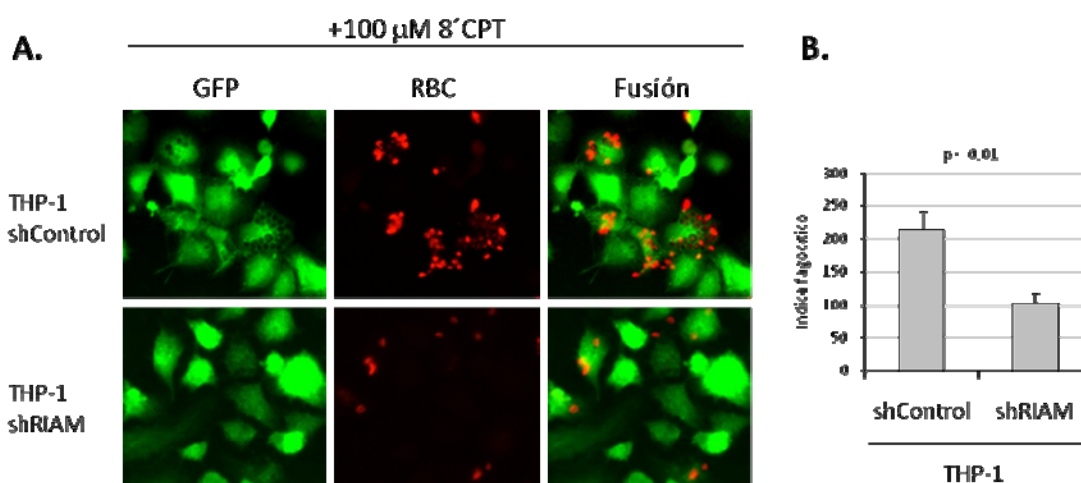


Figura 15: (A) Campo representativo después de realizar la fagocitosis con eritrocitos opsonizados con el complemento durante 1 hora a 37°C. Ambas líneas, shControl y shRIAM muestran fluorescencia de tipo GFP como medio para confirmar la incorporación de la construcción lentiviral (imagen izquierda), mientras que los eritrocitos fagocitados (RBC) han sido revelados usando fluorescencia en rojo como se puede ver en la imagen central. (B) Media de los índices fagocíticos de las células THP-1 shControl y shRIAM, obtenidas a partir del número de eritrocitos fagocitados y asociados por cada 100 células fagocíticas en los 15 campos analizados. RBC = Eritrocitos opsonizados.

6. RIAM ES ESENCIAL PARA LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR COMPLEMENTO EN MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Indudablemente, la presencia de RIAM en líneas celulares derivadas tanto a macrófagos como a granulocitos es un factor clave que influye en su capacidad para fagocitar dianas opsonizadas por el complemento, a través de su efecto sobre la activación de los receptores fagocíticos. Es por ello que la siguiente pregunta que nos hicimos es si esto sucede de la misma forma en células primarias de la sangre.

Elegimos realizar los experimentos sólo sobre macrófagos obtenidos *in vitro* por diferenciación de monocitos primarios con GM-CSF (MDMs) por su facilidad para ser mantenidos en cultivo, ya que la vida media de los granulocitos extraídos de la sangre es demasiado corta, alrededor de 8 horas, como para practicarles la interferencia de la proteína. Mediante un gradiente de densidad realizado sobre sangre humana obtenida de concentrados sanguíneos (*buffy coats*), procedimos a la separación de las células mononucleares. Estas células mononucleares fueron pasadas por una columna de selección positiva consistente en el marcador CD14 unido a bolas magnéticas, con la que conseguimos la purificación específica de los monocitos, objetivo de nuestro experimento. Una vez obtenidos los monocitos, éstos fueron sembrados sobre placas de cultivo en presencia de 1000 unidades/ml de GM-CSF y se permitió su diferenciación a macrófagos en estas condiciones durante 5 días a 37°C, momento en el que se les practicó una transducción con el sistema lentiviral shControl/shRIAM.

El resultado de la interferencia fue analizado mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) para comprobar la disminución de los transcritos de RNA mensajero en la población interferida respecto a la población control a la vez que se comprobaba la eficiencia de la transducción a través de la expresión del reportero GFP incorporado en el plásmido lentiviral, medido por citometría de flujo. La eficiencia de la infección lentiviral de los MDMs fue de aproximadamente entre un 15 y un 17% (**Figura 16**, panel **A**), si atendemos a la expresión de GFP. Haciendo relativos los niveles de expresión de RIAM determinados por RT-PCR, a la

eficiencia de transducción de cada experimento realizado, obtuvimos que la expresión de RIAM se veía reducida alrededor de un 30% en las células shRIAM comparadas con las células control cuando se hacían relativos la cantidad de transcritos detectados por RT-PCR a la eficiencia de la transducción (**Figura 16**, panel **B**). Asumiendo que las células que expresan GFP también expresan el shRNA de RIAM, los niveles de expresión de la proteína en la población total son compatibles con los niveles de transducción.

Para analizar el efecto de la supresión de la expresión de RIAM sobre estos MDMs, realizamos varios ensayos de fagocitosis con eritrocitos opsonizados con el complemento y marcados con DDAO-AM. Analizamos sólo el índice de asociación y el porcentaje de asociación debido al número limitante de células disponibles para cada experimento, y nos centramos en estos parámetros en base a los resultados obtenidos con las líneas celulares diferenciadas al linaje monocítico, donde las mayores diferencias se presentaban a nivel de asociación de la partícula. De este modo, la población de MDMs interferidos para RIAM y la población de MDMs control fueron incubadas 30 minutos con eritrocitos marcados con 2 μ M de DDAO-AM opsonizados con complemento, y tratadas o no con 100 μ M de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP durante 30 minutos

como estímulo para la fagocitosis a través de la activación de Rap1, utilizando como control del experimento eritrocitos marcados pero no opsonizados. La incorporación de GFP sólo por parte de las células eficientemente transducidas nos permitió restringir el efecto de la interferencia a dichas subpoblaciones celulares. Se observó que en las células verdes transducidas, se producía un descenso significativo en la capacidad fagocítica de los macrófagos cuando la expresión de RIAM era silenciada respecto a los macrófagos control donde la activación con el compuesto 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP inducía un incremento en fagocitosis, siguiendo la tendencia, además, a disminuir el porcentaje de células que se encuentran realizando activamente la fagocitosis en esas condiciones (**Figura 16**, panel **B**). Esta

RESULTADOS

situación queda patente cuando representamos las poblaciones obtenidas por citometría en un experimento representativo, en el que se puede apreciar claramente como, al seleccionar sobre el total de población las células que están expresando GFP y representar la fluorescencia de los eritrocitos marcados con DDAO-AM frente a la complejidad celular, se produce un aumento en la cantidad de eritrocitos que están siendo fagocitados únicamente en la población control cuando es estimulada con 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, reflejado en el aumento en la presencia de DDAO-AM en estas células, mientras que la población interferida para RIAM permanece sin responder al estímulo (**Figura 16**, paneles **C** y **D**). Tomados en conjunto, los datos obtenidos en MDMs nos permiten concluir que el papel esencial de RIAM sobre la

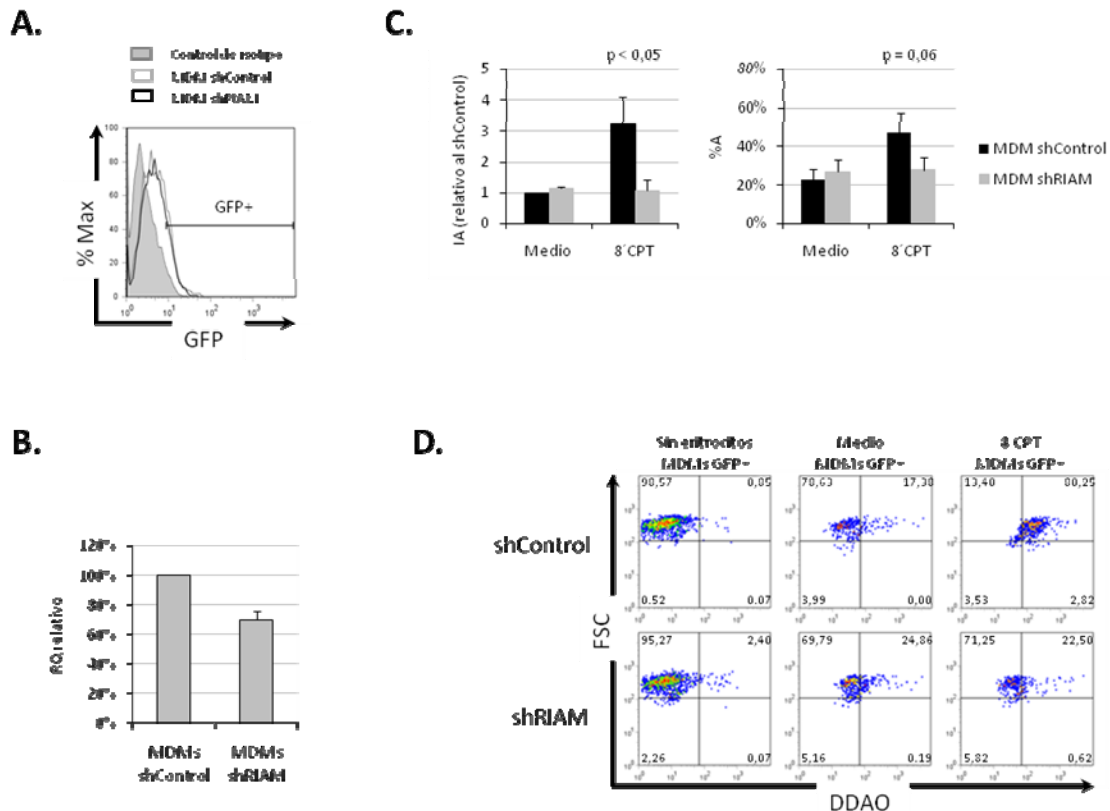


Figura 16: (A) Representación de la eficiencia de transducción de los vectores lentivirales shControl y shRIAM sobre la población de macrófagos derivados de monocitos sanguíneos (MDM) medida por la expresión de GFP, con una media de intensidad de fluorescencia correspondiente al 16% de las células totales. (B) Resultados de las RT-PCR realizadas sobre los MDMs infectados con el sistema lentiviral relativizados a la eficiencia de transducción (porcentaje de expresión de GFP) de cada experimento, con una bajada media de un 30% en la cantidad relativa de transcritos de ARN mensajero (RQ) en la población interferida para RIAM (C) Representación del índice de asociación (IA, gráfica izquierda) y del porcentaje de asociación (%A, gráfica derecha) para los macrófagos obtenidos de concentrados sanguíneos. Los datos de la IA fueron relativizados a los resultados de las células shControl sin estimular. (D) Representación de las poblaciones de macrófagos shControl y shRIAM transducidas eficientemente en un experimento representativo de opsonofagocitosis. Los cuadrantes izquierdos que representan las poblaciones iniciales que expresan GFP antes de la adición de los eritrocitos, sufren un desplazamiento al fagocitar los eritrocitos opsonizados, aumentando sólo la capacidad fagocítica de las células en la población control cuando es estimulada con 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (cuadrante superior derecho).

fagocitosis mediada por complemento es completamente extrapolable a la situación que se da *in vivo* en las células fagocíticas derivadas del linaje monocítico y a la activación de sus receptores fagocíticos del complemento a través de mecanismos ‘*inside-out*’ vía la activación de Rap1.

7. EL RECLUTAMIENTO DE TALINA A LA COPA FAGOCÍTICA SE VE DISMINUIDO EN CÉLULAS HL60 DIFERENCIADAS AL LINAJE GRANULOCÍTICO CON LA EXPRESIÓN DE RIAM INTERFERIDA

En el mecanismo molecular subyacente a la vía de señalización ‘*inside-out*’ hacia las integrinas que implica a Rap1 se encuentra como elemento central la unión de talina a la cola citoplasmática de la cadena β de la integrina, lo que permite el cambio conformacional que resulta en su activación (Watanabe et al, 2008). RIAM ya ha sido mostrada con anterioridad como la molécula que actúa como nexo de unión entre Rap1 y talina en la activación de algunas integrinas, como la $\alpha\text{IIb}\beta_3$, siendo su expresión capaz de modular la funcionalidad adhesiva de las mismas (Han et al, 2006; Lafuente et al, 2004), por lo que decidimos explorar la posibilidad de que se encontrara actuando también a ese nivel en la activación de $\alpha\text{M}\beta_2$ y la $\alpha\text{X}\beta_2$ afectando de ese modo a la fagocitosis mediada por estas integrinas.

Para ello, diseñamos un experimento de fagocitosis en el que pudiéramos visualizar el reclutamiento de talina a la copa fagocítica, y si este reclutamiento se veía o no afectado por la ausencia de RIAM. Se utilizaron las líneas celulares HL60 shControl y HL60 shRIAM sometidas a una diferenciación con 1 μM de ácido retinoico durante 4 días y activadas o no con 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, tras la que se incubaron 15 minutos a 37°C con eritrocitos opsonizados con complemento sobre portaobjetos tratados con poli-Lisina, y se fijaron con un 4% de paraformaldehído. El tiempo reducido en el que se permite que ocurra la fagocitosis fue determinado para prevenir la internalización excesiva de los eritrocitos, ya que lo que se pretende observar en este ensayo son las zonas de contacto diana opsonizada-receptor fagocítico. Una vez finalizada esta incubación, las células se incubaron con un anticuerpo específico frente a talina, detectado con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa-647, y con un anticuerpo IgG anti-eritrocitos, que fue detectado con un secundario conjugado con Alexa-555 (Figura 17). Durante el análisis por microscopía confocal se tomaron imágenes de cinco campos independientes para la línea shControl y otros cinco campos para la línea shRIAM, realizándose las tomas en seis planos focales para cada campo y obteniéndose los resultados para los parámetros área de colocalización e intensidad de píxeles en los contactos mediante el uso del programa de análisis y tratamiento de imagen Fiji.

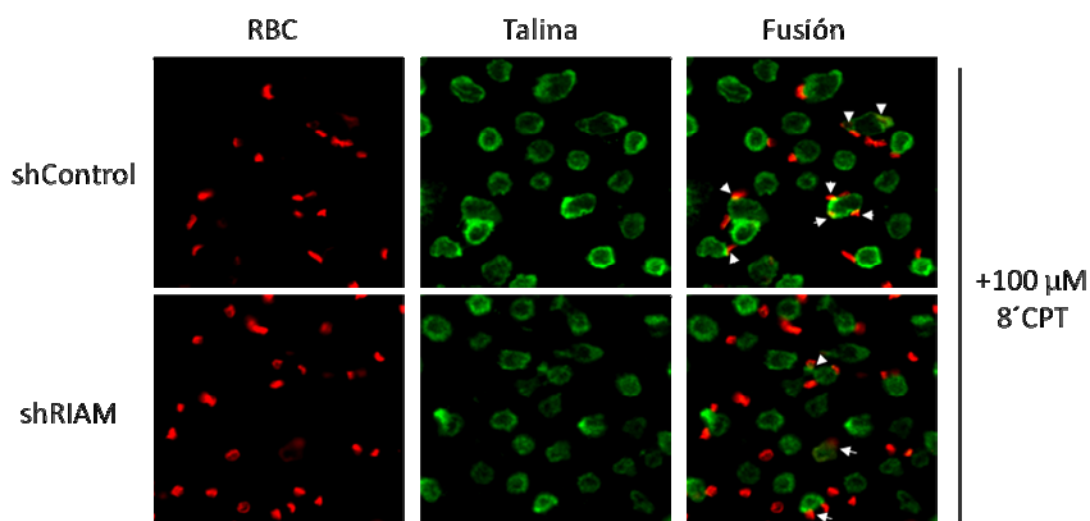


Figura 17: Campo representativo después de realizar la fagocitosis con eritrocitos opsonizados con el complemento. La colocalización de la fluorescencia de los eritrocitos marcados (rojo) y de la talina (verde), da el patrón de contacto de la copa fagocítica en formación con la partícula opsonizada (amarillo).

La **Figura 17** muestra la comparación de dos campos representativos para cada línea, en los que se puede apreciar que las zonas de contacto entre los eritrocitos (representados en rojo) y la posición de talina en la copa fagocítica (representada en verde) son menores en número en las células HL60 que tienen interferida la expresión de RIAM, lo que se ve reforzado por la media calculada a partir de los datos en todos los campos que es de $0,59 \pm 0,038$ para las células shControl y de $0,45 \pm 0,078$ para las shRIAM.

Así mismo, los valores obtenidos por la herramienta informática de análisis nos revelan que el área de coincidencia eritrocito opsonizado-talina también es menor en las células shRIAM, resultando además inferior la intensidad de los píxeles en la zona de contacto, indicativo de un menor reclutamiento de talina a la copa fagocítica en formación, lo que se pone ampliamente de manifiesto al centrar el foco de la imagen sobre una sola célula de cada una de las líneas (**Figura 18**).

Esto nos permitiría concluir que la ausencia de RIAM redundaría en una menor presencia de talina durante la fagocitosis mediada por los receptores de complemento que resulta en una menor activación de los mismos y, por tanto, una menor capacidad fagocítica, sentando este punto como la más que probable base molecular del efecto de RIAM sobre todo el proceso.

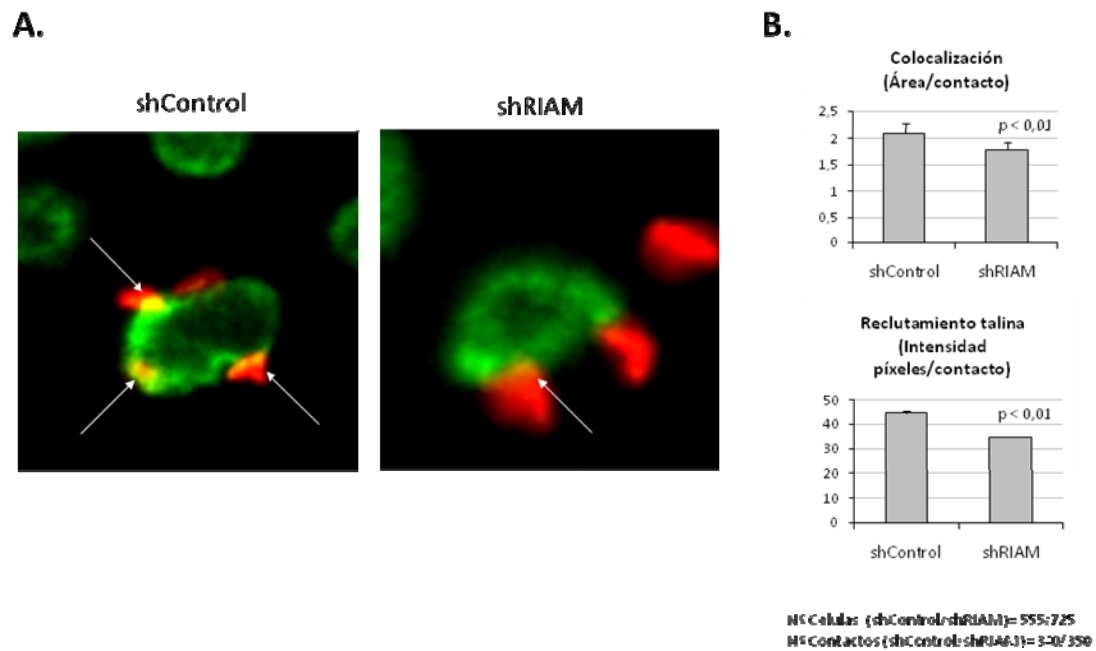


Figura 18: Ampliación sobre una célula de un campo representativo después de realizar la fagocitosis con eritrocitos opsonizados con el complemento con la línea shControl y la línea shRIAM diferenciadas a la estirpe granulocítica. Las flechas señalan las zonas de colocalización de la fluorescencia de los eritrocitos marcados (rojo) y de la talina (verde), sirviendo dicha colocalización (amarillo) para calcular el área de contacto de la copa fagocítica en formación con la partícula opsonizada. Las gráficas muestran los valores obtenidos tras el análisis de cinco campos independientes de seis planos focales cada uno.

DISCUSIÓN

El contenido de este trabajo doctoral se ha dirigido a la caracterización de la función de la proteína adaptadora RIAM en la fagocitosis mediada por complemento. La fagocitosis es el proceso fisiológico por el cual las células internalizan partículas de más de 0,5 micras de diámetro, entre las que pueden encontrarse material inorgánico, restos celulares, microorganismos, y células necróticas o apoptóticas, y juega un papel esencial en desarrollo, homeostasis y respuesta inmune (revisado por [Desjardins et al, 2005](#)). Los receptores fagocíticos pueden unir sus partículas diana de forma directa o de forma indirecta a través de opsoninas y pueden existir como receptores constitutivamente activos o cuya activación es inducida antes de la unión a sus dianas opsonizadas ([Underhill y Ozinsky, 2002](#)). Un claro ejemplo de estos receptores fagocíticos inducibles son los receptores de complemento CR3 y CR4, receptores de tipo integrina también conocidos como $\alpha M\beta 2$ (o Mac-1, o CD11b/CD18) y $\alpha X\beta 2$ (o p150,95, o CD11c/CD18). La fagocitosis mediada por estos receptores exige una precondition de activación en la que señales procedentes de otros receptores de superficie, como pueden ser los de quimioquinas o los PRRs, inducen un cambio conformacional que capacita a estas integrinas para unir ligando, lo que se conoce como activación *'inside-out'*. Esta señalización de tipo *'inside-out'* requiere de la activación de la pequeña GTPasa Rap1, así como de la interacción entre la proteína talina y la cola citoplasmática de la cadena β de las integrinas ([Lim et al, 2010](#)). Sin embargo, el mecanismo por el cual esta GTPasa regula la fagocitosis mediada por complemento y el reclutamiento de talina a las integrinas $\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$, es desconocido.

RIAM, una proteína adaptadora caracterizada como efector de Rap1, ha mostrado ser una proteína fundamental para regular la actividad de las integrinas en varios procesos dependientes de adhesión, como pueden ser la sinápsis inmunológica ([Ménasché et al, 2007](#)) o la migración celular ([Jenzora et al, 2005](#)). Esta proteína se ha relacionado con cambios en la afinidad de integrinas de tipo $\beta 1$ y $\beta 2$ ([Lafuente et al, 2004](#)), produce la localización en la membrana de Rap1 tras una estimulación ([Ménasché et al, 2007](#); [Lafuente et al, 2004](#)) y coinmunoprecipita y colocaliza en la célula con talina ([Worth et al, 2010](#); [Lee et al, 2009](#)), lo que sugiere la existencia de un complejo de señalización que implica a estas tres proteínas y que resulta en la activación de las integrinas. Recientemente se ha demostrado que este complejo es el responsable de la activación de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ y que RIAM es esencial para que ésta se produzca, ya que la interferencia en su expresión resulta en una disminución de la activación de las integrinas mediada por talina e inducida por Rap1 ([Han et al, 2006](#)). El mecanismo propuesto para mediar esta activación reside en la capacidad de RIAM para actuar como proteína de andamiaje y conectar las secuencias localizadoras a la membrana de Rap1 con talina, lo que permite localizar a esta última en la membrana plasmática en las proximidades de la cadena β de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ ([Lee et al, 2009](#)).

Nuestros resultados avalan también la implicación de este eje Rap1-RIAM-talina en la vía 'inside-out' de la activación de las integrinas $\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$ que culminaría en la fagocitosis mediada por complemento. Hemos utilizado modelos celulares que representan a las principales células fagocíticas, neutrófilos y macrófagos, en los que una disminución de la expresión de RIAM inducida por la expresión de shRNAs específicos, provoca una falta de respuesta a agentes activadores de la fagocitosis, tales como el fMLP o el LPS. El uso del compuesto 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, un activador específico para la GEF de Rap1 Epac, nos ha permitido situar a RIAM por debajo de esta GTPasa en la vía de activación de las integrinas fagocíticas. El hecho de que esta GEF estimule únicamente la activación de Rap1 y no de otras GTPasas, nos permite comprobar que el incremento en la activación de Rap1 no produce el aumento esperado en la capacidad fagocítica mediada por estas integrinas en las células con la expresión de RIAM interferida, sugiriendo que RIAM es la proteína efectora de Rap1 que media la activación de las integrinas $\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$.

Es más, la estimulación con fMLP o LPS no resulta en un incremento en la unión de fibrinógeno soluble, un sustrato de la $\alpha M\beta 2$, en células HL60 interferidas en la expresión de RIAM y diferenciadas a la estirpe granulocítica, y de forma análoga, la unión del anticuerpo sensor de activación de la integrina $\alpha M\beta 2$ CBRM1/5 se encuentra disminuida en líneas transducidas con la construcción shRIAM, indicando que RIAM tiene un papel clave en la regulación de la afinidad de la integrina $\alpha M\beta 2$.

Los resultados obtenidos con modelos en líneas celulares promielocíticas resultan completamente extrapolables a modelos con células humanas primarias, en los que la estimulación con 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica y en los que la expresión de RIAM ha sido interferida, no produce un incremento en la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con complemento. Esto sugiere que la señalización a través de la vía 'inside-out' se encuentra bloqueada en ausencia de RIAM, no siendo posible transmitir la señal de activación a los receptores del complemento. El efecto es específico para este tipo de fagocitosis, ya que al ensayar la unión e internalización de partículas opsonizadas con IgGs, no encontramos diferencias entre células con la expresión de RIAM interferida y sin interferir, lo que resalta que la influencia de RIAM podría estar restringida únicamente a receptores fagocíticos de tipo integrina y no deberse a un efecto de la interferencia sobre el proceso fagocítico en general.

El mecanismo molecular responsable del efecto funcional, según nuestros datos, implicaría un defecto en el reclutamiento de talina a la copa fagocítica en formación cuando la expresión de RIAM se encuentra interferida. Esto concuerda plenamente con los resultados obtenidos para otras integrinas, como la integrina $\alpha IIb\beta 3$ en megacariocitos y en células reconstituidas para la expresión de esta integrina, que demuestran que RIAM es la molécula efectora a través de la cual Rap1 es capaz de mediar la unión de talina a la cola citoplasmática de la subunidad β de la integrina (Han et al, 2006).

Nuestros datos contrastan fuertemente con los obtenidos por el grupo de E. Caron sobre el papel de RIAM como regulador de este tipo de fagocitosis. En concreto, según los resultados de este grupo, la interferencia de la expresión de RIAM parece no tener efecto en la fagocitosis

de eritrocitos opsonizados con el complemento dependiente de la integrina $\alpha\text{M}\beta 2$ en células THP-1 diferenciadas a macrófagos (Lim et al, 2010). Las diferencias observadas respecto a nuestros resultados residen probablemente en la distinta metodología usada por ambos grupos. Cabe resaltar que los cálculos del *Índice de Asociación* de eritrocitos son distintos, ya que mientras que en sus experimentos cuantifican la cantidad de eritrocitos unidos en base a una visualización de campos mediante tinción inmunocitoquímica, en los nuestros hemos utilizado la citometría de flujo, un método mucho más sensible que permite la cuantificación del efecto en un mayor número de células. Sin embargo, cuando hemos utilizado la misma línea celular y metodología que el grupo de Caron para el cálculo del *Índice de Asociación* de eritrocitos opsonizados con complemento, hemos detectado también importantes diferencias entre los niveles de fagocitosis en presencia o ausencia de expresión de RIAM (ver **Figura 14** en **Resultados**). Pensamos que entre las diferencias metodológicas responsables de la disimilitud en los resultados se podrían encontrar, por un lado, los estímulos usados para activar las células y, por otro, los tiempos de incubación con las partículas opsonizadas. En cuanto a los estímulos, en nuestros experimentos hemos usado un activador de Rap1 el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre células diferenciadas con el éster de forbol PMA, mientras que ellos usan PMA como estímulo sobre células que han sido diferenciadas con PMA. Podríamos especular que, en sus experimentos, al usar el mismo compuesto, un activador de la PKC, en la diferenciación hacia macrófagos y en la activación, las células podrían ser más refractarias a la activación 'inside out' que en nuestro caso, donde el agente diferenciador y el activador es diferente e independiente de PKC. En cuanto al tiempo de fagocitosis, hemos usado tiempos más largos de incubación de las células con las partículas opsonizadas, en concreto 1 hora versus 30 minutos usados por el grupo de Caron, permitiendo aumentar así el número de partículas fagocitadas. En relación con este hecho, cuando nosotros usamos un tiempo corto para analizar el reclutamiento a la copa fagocítica de talina, vemos diferencias muy pequeñas entre el número de contactos por célula establecidos entre las células con RIAM interferido y las controles, observándose las diferencias significativas en cuanto a la cantidad efectiva de talina que es reclutada a los contactos formados.

En base a todo esto, es posible deducir la existencia de dos efectos distintos producidos por la interferencia de RIAM, sin que hayamos podido demostrar por el momento que el segundo no sea directamente consecuencia del primero. En primer lugar, y totalmente apoyado por nuestros resultados en diferentes tipos de líneas celulares y con distintos shRNAs de interferencia de RIAM, tendríamos una afectación del primer nivel de fagocitosis de unión de la partícula a la célula fagocítica. De este modo, en una población celular policlonal interferida para la expresión de RIAM, el análisis del *Índice de Asociación* de la fagocitosis mediada por complemento se ve notablemente disminuido por la interferencia de RIAM cuando se hace un análisis a gran escala de toda la población, no siendo además capaces de responder las células a estímulos que deberían incrementarlo. En segundo lugar, la interferencia de RIAM podría afectar también a la internalización de los eritrocitos opsonizados, lo que se demuestra tanto por citometría con rangos de análisis de población altos, como por análisis inmunocitoquímico a tiempos largos. En estos experimentos claramente se puede observar que las células con la expresión de RIAM interferida no sólo unen eritrocitos en menor número que las células control, sino que apenas se observan células repletas de eritrocitos internalizados, hecho que

sí sucede en las células no interferidas. La propia naturaleza del proceso fagocítico en el que el resultado final sólo tiene lugar de forma efectiva si se han ido completando las fases secuencialmente -lo que quiere decir que sin reconocimiento no tiene lugar la unión de la partícula, y sin esta unión no puede proceder la internalización de la misma-, nos permite deducir que al menos parte de los efectos observados en cuanto al *Índice de Fagocitosis* pueden ser atribuidos a una activación deficiente de las integrinas a través de la vía de señalización 'inside-out' que afecte al primer paso de unión.

Sin embargo, no podemos descartar tampoco, dada la constitución de este complejo de señalización que incluye a Rap1 y la relación de RIAM con proteínas reorganizadoras del citoesqueleto, que la ausencia de RIAM tenga algún efecto sobre el agrupamiento de las integrinas ('clustering') post-unión del ligando que es el que finalmente consigue la fuerza tractora motriz que finaliza con el hundimiento de la partícula en el interior de la célula característico de este tipo de fagocitosis. En este sentido, es interesante hacer notar que muchos eventos mediados por integrinas que inducen enormes cambios morfológicos en las células, como por ejemplo la motilidad celular, están asociados con el citoesqueleto de actina ligado a las integrinas. Tanto RIAM, como su pariente altamente homólogo Lamellipodin estimulan la polimerización de actina probablemente a través de su unión a miembros de la familia Ena/VASP y a profilina, que catalizan el ensamblaje de F-actina y su ramificación (Krause et al, 2004; Lafuente et al, 2004). El silenciamiento de RIAM, o de Lamellipodin, puede incrementar marcadamente la ratio celular entre G-actina monomérica y F-actina filamentosa (Krause et al, 2004; Lafuente et al, 2004), por lo que es tentador, de esta manera, especular que el papel activador de la integrina mediado por RIAM está acoplado a cambios locales en el ensamblaje de actina. De hecho, muchos de los constituyentes de las adhesiones focales asociados a integrinas interaccionan activamente con actina para estabilizar la unión con ligandos de la matriz extracelular. Notablemente, el único representante de la familia MRL en *Drosophila*, Pico, también tiene la habilidad de cambiar la proporción entre G:F-actina hacia el estado polimerizado debido a un efecto directo en Ena (Lyulcheva et al, 2008). Por todo esto, nuestro laboratorio en la actualidad se encuentra encaminado al diseño de nuevos experimentos que nos permitan distinguir si estamos finalmente ante más de un efecto de RIAM sobre la fagocitosis mediada por complemento.

Por otro lado, aunque hemos conseguido determinar el efecto de la ausencia de RIAM, en principio, como un defecto en el reclutamiento de talina a la copa fagocítica que redundaría en una falta de activación de las integrinas fagocíticas, aún nos quedaría dilucidar en mayor detalle el mecanismo molecular subyacente al mismo y la regulación espacio-temporal de la formación del complejo de señalización.

Un mecanismo molecular por el cual RIAM podría regular la actividad de estos receptores fagocíticos de forma alternativa al reclutamiento de talina, sería que la interacción de RIAM se produjera de forma directa con una de las dos cadenas de estas integrinas. Un mecanismo similar se ha observado para RapL, también un efector de Rap1, que modula la actividad de la integrina LFA-1. RapL interacciona con una secuencia específica de la cola citoplasmática de la cadena α L de esta integrina de forma que desestabiliza la interacción entre ésta y la cadena β 2 y es capaz de este modo de incidir en su activación (Kinashi y Katagiri, 2004). Por experimentos

de supresión de la expresión de esta proteína en ratones, ya ha sido demostrado que RapL no está implicado en procesos derivados de la actividad de la integrina $\alpha M\beta 2$ (Kinashi y Katagiri, 2005), como son la fagocitosis mediada por complemento, que nos ocupa en el presente trabajo, o el reclutamiento de neutrófilos al lugar de la infección. Estos datos podrían constituir una primera aproximación a un modelo en el que RIAM y RapL funcionan como efectores de Rap1, repartiéndose ambos la regulación de distintas integrinas leucocitarias influyendo sobre la cadena que difiere entre ellas para activar los diferentes procesos adhesivos que requieren en cada momento las señales promovidas por cada entorno celular. En ese sentido, en una nueva dirección de avance, nuestro grupo se ha planteado realizar experimentos de interacción *in vitro* entre la cadena αM y RIAM, así como experimentos de inmunoprecipitación con RIAM en células que sobreexpresen únicamente la cadena αM y no la $\beta 2$.

Una segunda posibilidad de análisis de la naturaleza de las interacciones durante el proceso de activación de la integrina $\alpha M\beta 2$ estaría constituida por la posible actividad de RIAM sobre la cadena $\beta 2$ de Mac-1, bien por interacción directa o bien por su acción sobre el reclutamiento de talina. Para ello, a lo largo de este trabajo, además de los experimentos de microscopía confocal descritos en el apartado de **Resultados** (ver **Figura 17**), hemos intentado llevar a cabo experimentos de inmunoprecipitación que nos permitieran determinar si la presencia o ausencia de RIAM en un complejo con la cadena α o β de la integrina $\alpha M\beta 2$ afectaba a la presencia o no de talina en el mismo, es decir a su reclutamiento. Sin embargo, no hemos sido capaces de dilucidar nada en un sentido u otro en gran parte por carecer de herramientas adecuadas que nos permitieran detectar las proteínas implicadas. Quedaría pendiente para una futura investigación si la utilización de otras técnicas, entre las que el uso de transferencia de fluorescencia por energía de resonancia (FRET, de *Förster resonance energy transfer*) podría tener un papel destacado, nos permitirá llegar a una conclusión final sobre la verdadera secuencia de interacciones que subyace al mecanismo de activación de las integrinas durante el proceso fagocítico.

En esta última línea de trabajo sobre la cadena $\beta 2$, recientemente el grupo dirigido por Emmanuelle Caron ha conseguido arrojar algo más de luz sobre la cuestión, identificando a la serina 756 en estado fosforilado como un residuo clave para que se produzca el reclutamiento de Rap1 a la cadena $\beta 2$ (Lim et al, 2011). Sin embargo, sus experimentos revelan que este residuo sólo se encuentra parcialmente implicado en la asociación de talina a la cola $\beta 2$ de la integrina, lo que sugiere a los investigadores que otras moléculas puedan ser necesarias para que se produzca el reclutamiento de talina. A pesar de que estos autores no reconocen la implicación de RIAM en dicho proceso (Lim et al, 2010), nosotros pensamos que podría encajar muy bien en este panorama molecular y ser *de facto* la proteína que falta en el esquema y que permite el reclutamiento final de talina a la cadena $\beta 2$ de la integrina. En el modelo propuesto por el trabajo de Lim y colaboradores, se indica que la quinasa CaMKII (de Ca^{2+} /calmodulin kinase II) actuaría sobre la serina 756 en la cadena $\beta 2$ permitiendo el reclutamiento de Rap1 a la integrina, que de este modo sería capaz de producir la exposición de la cabeza globular de talina y por tanto su unión a la integrina y la activación de la misma. Esta misma quinasa funcionaría también más arriba de Rap1, posiblemente regulando una proteína GEF y

promoviendo de ese modo la activación de Rap1, aunque esto no se demuestra experimentalmente en su artículo.

La quinasa CaMKII es una quinasa que actúa en serinas y treoninas de forma dependiente de Ca^{2+} que se ha implicado en regulación de la expresión génica, tráfico de membranas, secreción, dinámica del citoesqueleto, apoptosis y fagocitosis de células apoptóticas tumorales dependiente de la integrina $\beta 3$ (Poggi et al, 2002). La actividad de la CaMKII se encuentra regulada por la unión de calcio/calmodulina, autofosforilación de sitios inhibitorios y activadores y la acción de proteínas fosfatasa (Hudmon y Schulman, 2002). De forma interesante, estímulos capaces de activar la fagocitosis como el fMLP y el LPS y algunas quimioquinas, se han relacionado con la formación de diacilglicerol y la liberación de Ca^{2+} intracelular (Alterai y Zhelev, 1997; Chow et al, 1995; Chandler et al, 1983), habiéndose observado que las concentraciones locales de Ca^{2+} intracelular se incrementan de forma transitoria en los lugares de formación de la copa fagocítica y durante la formación de los fagolisosomas, aunque su función en ese contexto aún es controvertida (Sawyer et al, 1985).

En ese sentido y a pesar de que aún no ha sido investigado en la activación de integrinas en el modelo de células CHO capaces de responder a trombina o en plaquetas, los autores del estudio que implica al complejo Rap1-RIAM-talina en la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ creen que la proteína GEF relevante que podría estar implicada en el proceso podría ser la CalDAG-GEF1 (Han et al, 2006). CalDAG-GEF1 responde a Ca^{2+} y diacilglicerol y su silenciamiento interfiere con la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Crittenden et al, 2004; Eto et al, 2002), siendo un apoyo para esta hipótesis el derivado de la observación de que mutaciones en CalDAG-GEF1 son las responsables de la deficiencia de adhesión leucocitaria de tipo III (LAD III), en la que las integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ se expresan en niveles normales, pero presentan defectos en su activación (Bergmeier et al, 2007; Pavlosky et al, 2007). Por otro lado, resultados recientes han relacionado a la proteína GEF de Rap1 Epac, utilizada en el presente trabajo para producir una activación selectiva de Rap1, con la CaMKII, estableciendo que la activación de Epac dependiente de esta quinasa es la responsable de la liberación de Ca^{2+} en miocitos cardíacos de forma independiente de la PKA (Pereira et al, 2007). Rap1 ha mostrado con anterioridad ser capaz de activar a la PLC ϵ en respuesta a Epac, sugiriendo que esta GEF podría influenciar la producción de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) (Oestreich et al, 2007; Schmidt et al, 2001), de forma que la movilización subsecuente de Ca^{2+} inducida por el IP_3 podría activar a la CaMKII.

Todo ello tomado en conjunto hace ver que se necesitará investigar más allá a partir de estos datos para dilucidar completamente todos los pasos moleculares que conducen a la activación de Rap1 y, por supuesto, todos los pasos derivados de dicha activación. En este escenario, el uso de aproximaciones experimentales utilizando moduladores de la actividad de la quinasa CaMKII y mutantes de la cadena $\beta 2$ constitutivamente fosforilados o no sobre nuestros modelos celulares de interferencia de RIAM, podrían ayudar a descifrar cómo la activación de Rap1 y su reclutamiento a la cadena $\beta 2$ de la integrina son capaces de redundar en el reclutamiento de talina a sus lugares de interacción con la cola citoplasmática de la integrina

durante la fagocitosis mediada por complemento, estableciéndose un puente de interacción directa entre la acción de la GTPasa y el reclutamiento de talina a través de RIAM.

Una última posibilidad, compatible del todo con el anterior modelo, sería que RIAM no tuviera una interacción directa con las cadenas de la integrina. En este caso, su forma de ser reclutada a la membrana plasmática podría ser similar a la que sufre durante la activación del TCR en los linfocitos T, en la que la translocación de RIAM se consigue mediante su interacción con una red de proteínas adaptadoras que forma un andamiaje para crear un complejo de señalización crítico para la localización de Rap1 activo en las proximidades de la integrina (Ménasché et al, 2007). En este escenario, la fosforilación del residuo de serina 756 en la cadena $\beta 2$ en respuesta a un estímulo activador de la fagocitosis podría constituir uno de los eventos iniciales de la señalización *'inside-out'* que desencadenara la formación de este complejo, y que culminaría con el reclutamiento de talina por parte de RIAM a la copa fagocítica.

Aunque Rap1 produce la translocación de la talina desde el citoplasma a los complejos de integrinas se ha mostrado que no es la molécula que libera a la cabeza globular de la talina de la unión a su dominio autoinhibitorio (Han et al, 2006; Critchley, 2005). Por tanto, podemos imaginar un modelo de activación de la integrina en el que la función principal de la GTPasa, entre otras posibles y/o accesorias, fuera la de localizar a RIAM en la membrana plasmática, con ayuda de otras proteínas adaptadoras o no, cerca de la integrina $\alpha M\beta 2$, tras la estimulación con un agonista por la vía *'inside-out'*. En apoyo a esta hipótesis tendríamos los experimentos de Lee y colaboradores, en los que la expresión de una proteína de fusión entre un pequeño motivo del N-terminal de RIAM, que constituye la zona de interacción entre esta proteína y la talina, y la caja CAx situada en el C-terminal de Rap1, zona sugerida como responsable de la localización de Rap1 a la membrana plasmática, es suficiente para translocar talina hasta los complejos de integrinas (Lee et al, 2009).

En nuestro modelo, RIAM reclutaría a talina a la cola citoplasmática de la subunidad $\beta 2$ de la integrina, sin embargo queda por determinar si RIAM al unirse a talina sería capaz de promover su activación al liberarla de las interacciones intramoleculares que provocan su autoinhibición. Alternativamente y en ese sentido es remarcable destacar que sería posible especular que el dominio PH de RIAM, al tener la capacidad de interactuar con fosfoinosítidos, pudiera encargarse de unir y situar a talina en las proximidades del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, propuesto como uno de los mecanismos activadores de esta molécula, ya que este compuesto ha mostrado inducir un cambio conformacional que desenmascara el sitio de unión a la cola de la integrina en el dominio FERM de la talina (Goksoy et al, 2008; Martel et al, 2001).

En cualquier caso, nuevos estudios tendrán que llevarse a cabo para poder resolver todos estos temas en profundidad y permitir que la secuencia espacio-temporal de acontecimientos en el proceso de fagocitosis mediado por receptores de complemento de tipo integrinaj, en los que este trabajo sitúa ya a RIAM de forma indudable con un papel esencial, sea descifrada de forma definitiva.

CONCLUSIONES

1. RIAM regula la activación de la integrina $\alpha M\beta 2$ en respuesta a estímulos que inducen la fagocitosis, modulando su capacidad para unir ligando.
2. RIAM es una proteína esencial para la fagocitosis mediada por complemento en modelos celulares de células fagocíticas y en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica.
3. La fagocitosis mediada por complemento inducida por la activación de Rap1 requiere la expresión de RIAM, situando a esta proteína en la vía de señalización *'inside-out'* reguladora de las integrinas fagocíticas.
4. Los niveles de expresión de RIAM afectan a la cantidad de talina que se localiza en la copa fagocítica, sugiriendo que una de las posibles funciones de RIAM en la fagocitosis es mediar el reclutamiento de esta proteína a la integrina $\alpha M\beta 2$.

BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

Han J, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, Calderwood DA, Puzon-McLaughlin W, Lafuente EM, Boussiotis VA, Shattil SJ, Ginsberg MH. *Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin α 5 β 1*. **Curr Biol** 2006, 16:1796-1806

Lafuente EM, van Puijenbroeck AA, Krause M, Carman CV, Freeman GJ, Berezovskaya A, Constantine E, Springer TA, Gertler FB, Boussiotis VA. *RIAM, an Ena/VASP and profiling ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion*. **Dev Cell** 2004, 7:585-595

INTRODUCCIÓN

Inmunidad innata y fagocitosis

Aderem A, Wright SD, Silverstein SC, Cohn ZA. *Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages*. **J Exp Med** 1985, 161:617-622

Aderem A, Underhill DM. *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. **Annu Rev Immunol** 1999, 17:593-623

Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, du Clos TW. *The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fc γ receptor II*. **J Exp Med** 1999, 190:585-590

Bharadwaj D, Mold C, Markham E, du Clos TW. *Serum amyloid P component binds to Fc γ receptors and opsonizes particles for phagocytosis*. **J Immunol** 2001, 166:6735-6741

Blystone SD, Brown EJ. *Integrin receptors of phagocytes. Phagocytosis: The Host*. Ed S. Gordon, 1999, pp 103-147, Stamford, CT:JAI

Brown GD, Gordon S. *Immune recognition. A new receptor for beta-glucans*. **Nature** 2001, 413:36-37

Cardelli J. *Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct*. **Traffic** 2001, 2:311-320

Caron E, Hall E. *Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases*. **Science** 1998, 282:1717-1721

Caron E. *Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges*. **J Cell Sci** 2003, 116:435-440

Chuang TH, Ulevitch RJ. *Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 y hTLR9*. **Eur Cytokine Netw** 2000, 11:372-378

Chuang TH, Ulevitch RJ. *Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells*. **Biochim Biophys Acta** 2001, 1518:157-161

Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. *Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite*. **J Immunol** 2001, 167:416-423

Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. **Nat Immunol** 2004, 5:1219-1226

Corcoran L, Ferrero I, Vremec D, Lucas K, Waithman J, O'Keeffe M, Wu L, Wilson A, Shortman K. *The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells*. **J Immunol** 2003, 170:4926-4932

Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. *Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution*. **Eur Cytokine Netw** 2000, 11:362-371

Dziarski R, Tapping RI, Tobias PS. *Binding of bacterial peptidoglycan to CD14*. **J Biol Chem** 1998, 273:8680-8690

Dziarski R, Platt KA, Gelius E, Steiner H, Gupta D. *Defect in neutrophil killing and increased susceptibility to infection with nonpathogenic gram-positive bacteria in peptidoglycan recognition*

- protein-S (PGRP-S)-deficient mice. **Blood** **2003**, 102:689-697
- Ehlers MR. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. **Microbes Infect** **2000**, 2:289-294
- Ezekowitz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. **J Exp Med** **1990**, 172:1785-1794
- Fällman M, Andersson R, Andersson T. Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. **J Immunol** **1993**, 151:330-338
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science** **2010**, 327:656-661
- Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, Tas SW, Jensenius JC, Nicholson-Weller A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. **J Exp Med** **2000**, 192:1797-1808
- Girardin SE, Travassos LH, Herve M, Blanot D, Boneta LG, Philpott DJ, Sansonetti PJ, Mengin-Leucreux D. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. **J Biol Chem** **2003**, 278:702-708
- Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. **Curr Opin Immunol** **2002**, 14:136-145
- Grimsley C, Ravichandran KS. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't-eat-me and come-get-me signals. **Trends Cell Biol** **2003**, 13:648-656
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell** **1998**, 52:269-279
- Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim S, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Beutler B. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signaling. **Nature** **2003**, 424:743-748
- Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** **1989**, 54:1-13
- Kang D, Liu G, Lundström A, Gelius E, Steiner H. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. **Proc Nat Acad Sci** **1998**, 95:10078-10082
- Kauffman SH. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. **Nat Rev Microbiol** **2007**, 5:491-504
- Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, Jack RM, Nicholson-Weller A. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. **Immunity** **1997**, 7:345-355
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell** **1996**, 86:973-983
- Liu C, Gelius E, Liu G, Steiner H, Dziarski R. Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils, and inhibits bacterial growth. **J Biol Chem** **2000**, 275:24490-24499
- Liu C, Xu Z, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. **J Biol Chem** **2001**, 276:34686-34694
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature** **1997**, 388:394-397
- Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity. **New Eng J Med** **2000**, 343:338-344
- Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell** **2001**, 106:255-258
- Mold C, Gresham HD, du Clos TW. Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs. **J Immunol** **2001**, 166:1200-1205
- Nepomuceno RR, Henschen-Edman AH, Burgess WH, Tenner AJ. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. **Immunity** **1997**, 6:119-129
- O'Neill LAJ. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. **Trends Immunol** **2004**, 25:687-693

Olazabal IM, Caron E, May RC, Schilling K, Knecht DA, Machesky LM. *Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR phagocytosis*. **Curr Biol** **2002**, 12:1413-1418

Platt N, Gordon S. *Is the class A macrophage scavenger receptor (SRA) multifunctional?-The mouse's tale*. **J Clin Invest** **2001**, 108:649-654

Pommier CG, Inada S, Fries LF, Takahashi T, Frank MM, Brown EJ. *Plasma fibronectin enhances phagocytosis of opsonized particles by human peripheral blood monocytes*. **J Exp Med** **1983**, 157:1844-1854

Raghavan M, Bjorkman PJ. *Fc receptors and their interactions with immunoglobulins*. **Annu Rev Cell Dev Biol** **1996**, 12:181-220

Ravetch JV, Bolland S. *IgG Fc Receptors*. **Annu Rev Immunol** **2001**, 19:275-290

Richards ML, Katz DH. *Biology and chemistry of low affinity IgE receptor (Fc epsilon RII/CD23)*. **Crit Rev Immunol** **1991**, 11:65-86

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. *A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll*. **Proc Nat Acad Sci USA** **1998**, 95:588-593

Ross GD, Reed W, Dalzell JG, Becker SE, Hogg N. *Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3b-opsonized erythrocytes*. **J Leukoc Biol** **1992**, 51:109-117

Schiff DE, Kline L, Soldau K, Lee JD, Pugin J, Tobias PS, Ulevitch RJ. *Phagocytosis of gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism*. **J Leukoc Biol** **1997**, 62:786-794

Stuart LM, Ezekowitz RA. *Phagocytosis: Elegant complexity*. **Immunity** **2005**, 22(5):539-550

Underhill DM, Ozinsky A. *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. **Annu Rev Immunol** **2002**, 20:825-852

van Spruiel AB, van den Herik-Oudijk IE, van Sorge NM, Vile HA, van Strijp JA, van de Winkel JG. *Effective phagocytosis and killing of Candida albicans via targeting Fcγ3RI (CD64) or FcαRI (CD89) on neutrophils*. **J Infect Dis** **1999**, 179:661-669

van der Laan LJ, Dopp EA, Haworth R, Pikkarainen T, Kangas M, Elomaa O, Dijkstra CD, Gordon S, Tryggevason K, Kraal G. *Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo*. **J Immunol** **1999**, 162:939-947

Wright SD, Griffin FM Jr. *Activation of phagocytic cells CR3 receptors for phagocytosis*. **J Leuk Biol** **1985**, 38:327-339

Zarembka KA, Godowski PJ. *Tissue expression of human toll-like receptors and differential regulation of toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines*. **J Immunol** **2002**, 168:554-561

Integrinas, mecanismos de activación

Abram CL, Lowell CA. *The ins and outs of leukocyte integrin signaling*. **Annu Rev Immunol** **2009**, 27:339-362

Aderem A, Underhill DM. *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. **Annu Rev Immunol** **1999**, 17:593-623

Al-Awqati Q. *Terminal differentiation in epithelia: the role of integrins in hemisin polymerization*. **Annu Rev Physiol** **2011**, 73:401-412

Allen LA, Aderem A. *Molecular definitions of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc- receptor-mediated phagocytosis in macrophages*. **J Exp Med** **1996**, 184:627-637

Altieri DC, Bader R, Manucci PM, Edgington TS. *Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen*. **J Cell Biol** **1988**, 107:1893-1900

Armulik A, Nilsson I, von Heijne G, Johansson S. *Determination of the border between the transmembrane and cytoplasmic domains of human integrin subunits*. **J Biol Chem** **1999**, 274:37030-37034

Assoian RK. *Anchorage-dependent cell cycle progression*. **J Cell Biol** **1997**, 136:1-4

Bailey P, Tontti E, Hermand P, Cartron JP, Gahmberg CG. *The red cell LW blood group protein is an*

intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. **Eur J Immunol** **1995**, 25:3316-3320

Banno A, Ginsberg MH. Integrin activation. **Biochem Soc Trans** **2008**, 36:229-234

Beckerle MC. The adhesion plaque protein, talin, is phosphorylated in vivo in chicken embryo fibroblasts exposed to tumor-promoting phorbol ester. **Cell regul** **1990**, 1:227-236

Beglova N, Blacklow SC, Takagi J, Springer TA. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. **Nat Struct Biol** **2002**, 9:282-287

Beller DI, Springer TA, Schreiber RD. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human three complement receptor. **J Exp Med** **1982**, 156:1000-1009

Bergmeier W, Goerge T, Wang HW, Crittenden JR, Baldwin AC, Cifuni SM, Housman DE, Graybiel AM, Wagner DD. Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEF1 represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. **J Clin Invest** **2007**, 117:1699-1707

Bertagnolli ME, Locke SJ, Hensler ME, Bray PF, Beckerle MC. Talin distribution and phosphorylation in thrombin-activated platelets. **J Cell Sci** **1993**, 106:1189-1199

Brown EJ. The role of extracellular matrix proteins in the control of phagocytosis. **J Leukoc Biol** **1986**, 39:579-591

Brown NH, Gregory SL, Rickoll WL, Fessler LI, Prout M, White RA, Fristrom JW. Talin is essential for integrin function in *Drosophila*. **Dev Cell** **2002**, 3:569-579

Burke RD. Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. **Int Rev Cytol** **1999**, 191:257-284

Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. **Mol Cell** **2000**, 6:851-860

Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJ, Hynes RO, Ginsberg MH. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. **J Biol Chem** **1999**, 274:28071-28074

Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, Álvarez BG, Fujioka Y, Liddington RC, Ginsberg MH. The phosphotyrosine-binding domain of talin activates integrins. **J Biol Chem** **2002**, 277:21749-21758

Calderwood DA, Ginsberg MH. Talin forges the links between integrins and actin. **Nat Cell Biol** **2003**, 5:694-697

Calderwood DA. Integrin activation. **J Cell Sci** **2004**, 117:657-666

Campbell ID, Ginsberg MH. The talin-tail interaction places integrin activation on FERM ground. **Trends Biochem Sci** **2004**, 29:429-435

Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. **Science** **1998**, 282:1717-1721

Caron E, Self AJ, Hall A. The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. **Curr Biol** **2000**, 10:974-978

Coluzzi-Guyon E, Niedergang F, Wallar BJ, Peng J, Alberts AS, Chavrier P. A role for mammalian diaphanous related formins in complement receptor (CR3)-mediated phagocytosis in macrophages. **Curr Biol** **2005**, 15:2007-2012

Cram E, Clark S, Schwartzbauer JE. Talin loss-of-function uncovers roles in cell contractility and migration in *C. elegans*. **J Cell Sci** **2003**, 116:3871-3878

Critchley DR. Focal adhesions: the cytoskeletal connection. **Curr Opin Cell Biol** **2000**, 12:133-139

Critchley DR. Genetic, biochemical and structural approaches to talin function. **Biochem Soc Trans** **2005**, 33:1308-1312

Datta A, Huber F, Boettiger D. Phosphorylation of $\beta 3$ integrin controls ligand binding strength. **J Biol Chem** **2002**, 277:3943-3949

Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, García-Aguilar J, Hibbs ML, Springer TA. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). **J Cell Biol** **1990**, 111:3129-3139

Diamond MS, García-Aguilar J, Bickford JK, Corbí AL, Springer TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for

- four distinct adhesion ligands. **J Cell Biol** **1993**, 1031-1043
- Diamond MS, Alon R, Parkos CA, Quinn MT, Springer TA. Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). **J cell Biol** **1995**, 130:1473-1482
- Du X, Gu M, Weisel JW, Nagaswami C, Bennett JS, Bowditch RD, Ginsberg MH. Long range propagation of conformational changes in integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. **J Biol Chem** **1993**, 268:23087-23092
- Dupuy AG, Caron E. Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. **J Cell Sci** **2008**, 121:1773-1783
- Erb EM, Tangemann K, Bohrmann B, Muller B, Engel J. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. **Biochemistry** **1997**, 36:7395-7402
- Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, Hogg N. Integrins in immunity. **J Cell Sci** **2009**, 122:215-225
- Fagerholm SC, Hilden TJ, Nurmi SM, Gahmberg CG. Specific integrin α and β chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms. **J Cell Biol** **2005**, 171:705-715
- Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, Hughes PE, Pampori N, Shattil SJ, Saven A, Mueller BM. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. **Proc Nat Acad Sci USA** **2001**, 98:1853-1858
- García-Álvarez B, de Pereda JM, Calderwood DA, Ulmer TS, Critchley D, Campbell ID, Ginsberg MH, Liddington RC. Structural determinants of integrin recognition by talin. **Mol Cell** **2003**, 11:49-58
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. **Science** **1999**, 285:1028-1032
- Ginsberg MH, Yaspan B, Forsyth J, Ulmer TS, Campbell ID, Slepak M. A membrane-distal segment of the integrin αIIb cytoplasmic domain regulates integrin activation. **J Biol Chem** **2001**, 276:22514-22521
- Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ. Integrin regulation. **Curr Opin Cell Biol** **2005**, 17:509-516
- Hamada K, Shimizu T, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S, Hakoshima T. Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. **EMBO J** **2003**, 22:502-514
- Hato T, Pampori N, Shattil SJ. Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling function of integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. **J Cell Biol** **1998**, 141:1685-1695
- Hibbs ML, Jakes S, Stacker SA, Wallace RW, Springer TA. The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte-associated antigen 1 β subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. **J Exp Med** **1991a**, 174:1227-1238
- Hibbs ML, Xu H, Stacker SA, Springer TA. Regulation of adhesion to ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin β subunit. **Science** **1991b**, 251:1611-1613
- Hogg N, Henderson R, Leitinger B, McDowall A, Porter J, Stanley P. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. **Immunol Rev** **2002**, 186:164-171
- Hughes PE, O'Toole TE, Ylanne J, Shattil SJ, Ginsberg MH. The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. **J Biol Chem** **1995**, 270:12411-12417
- Humphries MJ, McEwan PA, Barton SJ, Buckley PA, Bella J, Mould AP. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. **Trends Biochem Sci** **2003**, 28:313-320
- Huttenlocher A, Ginsberg MH, Horwitz AF. Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. **J Cell Biol** **1996**, 134:1551-1562
- Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell** **1987**, 48:549-554
- Hynes RO, Zhao Q. The evolution of cell adhesion. **J Cell Biol** **2000**, 150:F89-F96
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell** **2002**, 110:673-687
- Isenberg WM, McEver RP, Phillips DR, Shuman MA, Bainton DF. The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced

ligand binding and receptor clustering. **J Cell Biol** **1987**, 104:1655-1663

Johansson MW, Larsson E, Luning B, Pasquale EB, Ruoslahti E. *Altered localization and cytoplasmic domain-binding properties of tyrosine-phosphorylated $\beta 1$ integrin.* **J Cell Biol** **1994**, 126:1299-1309

Kassner PD, Hemler ME. *Interchangeable α chain cytoplasmic domains play a positive role in control of cell adhesion mediated by VLA-4, a $\beta 1$ integrin.* **J Exp Med** **1993**, 178:649-660

Katagiri K, Hattori M, Minato N, Irie S, Takatsu K, Kinashi T. *Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase.* **Mol Cell Biol** **2000**, 20:1956-1969

Katagiri K, Maeda A, Shimonaka M, Kinashi T. *RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1.* **Nat Immunol** **2003**, 4:741-748

Kawaguchi S, Hemler ME. *Role of the α subunit cytoplasmic domain in regulation of adhesive activity mediated by the integrin VLA-2.* **J Biol Chem** **1993**, 268:16279-16285

Keller RS, Shai SY, Babbitt CJ, Pham CG, Solaro RJ, Valencik ML, Loftus JC, Ross RS. *Disruption of integrin function in the murine myocardium leads to perinatal lethality, fibrosis, and abnormal cardiac performance.* **Am J Pathol** **2001**, 158:1079-1090

Kim M, Carman CV, Springer TA. *Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins.* **Science** **2003**, 301:1720-1725

Kinashi T, Katagiri K. *Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule RapL.* **Immunol Lett** **2004**, 93:1-5

Kinashi T. *Intracellular signaling controlling integrin activation in lymphocytes.* **Nat Rev Immunol** **2005**, 5:546-559

Kinbara K, Goldfinger LE, Hansen M, Chou FL, Ginsberg MH. *Ras GTPases: integrins' friends or foes?* **Nat Rev Mol Cell Biol** **2003**, 4:767-776

Knezevic I, Leisner T, Lam S. *Direct binding of the platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb-IIIa) to talin.* **J Biol Chem** **1996**, 271:16416-16421

Kuijpers TW, van de Vijver E, Weterman MA, de Boer M, Tool AT, van den Berg TK, Moser M, Jakobs ME, Seeger K, Sanal Ö, Ünal S, Çetin M, Roos D, Verhoeven AJ, Baas F. *LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3.* **Blood** **2009**, 113:4740-4746

Kuo JC, Wang WJ, Yao CC, Wu PR, Chen RH. *The tumor suppressor DAPK inhibits cell motility by blocking the integrin-mediated polarity pathway.* **J Cell Biol** **2006**, 172:619-631

Legate KR, Wickström SA, Fässler R. *Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling.* **Genes Dev** **2009**, 23:397-418

Leisner TM, Wencel-Drake JD, Wang W, Lam SC. *Bidirectional transmembrane modulation of integrin $\alpha IIb\beta 3$ conformations.* **J Biol Chem** **1999**, 274:12945-12949

Li R, Mitra N, Gratkowski H, Vilaire G, Litvinov R. *Activation of integrin $\alpha IIb\beta 3$ by modulation of transmembrane helix associations.* **Science** **2003**, 300:795-798

Liddington RC, Ginsberg MH. *Integrin activation takes shape.* **J Cell Biol** **2002**, 158:833-839

Lim J, Wiedemann A, Tzircotis G, Monkley SJ, Critchley DR, Caron E. *An essential role for talin during $\alpha M\beta 2$ -mediated phagocytosis.* **Mol Biol Cell** **2007**, 18:976-985

Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. *Integrin cytoplasmic-binding proteins.* **J Cell Sci** **2000**, 113:3563-3571

Lo SK, Detmers PA, Levin SM, Wright SD. *Transient adhesion of neutrophils to endothelium.* **J Exp Med** **1989**, 169:1779-1793

Luo BH, Springer TA. *Integrin structures and conformational signaling.* **Curr Opin Cell Biol** **2006**, 18:579-586

Luo BH, Carman CV, Springer TA. *Structural basis of integrin regulation and signaling.* **Annu Rev Immunol** **2007**, 25:619-647

Martel V, Racaud-Sultan C, Dupe S, Marie C, Paulhe F, Galmiche A, Block MR, Albiges-Rizo C. *Conformation, localization and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides.* **J Biol Chem** **2001**, 276:21217-21227

- Martinez Gakidis MA, Cullere X, Olson T, Wilsbacher JL, Zhang B, Moores SL, Ley K, Swat W, Mayadas T, Brugge JS. *Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils*. **J Cell Biol** **2004**, 166:273-282
- Martin-Bermudo MD, Dunin-Burkowski OM, Brown NH. *Modulation of integrin activity is vital for morphogenesis*. **J Cell Biol** **1998**, 141:1073-1081
- May RC, Caron E, Hall A, Machesky LM. *Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcgammaR or CR3*. **Nat Cell Biol** **2000**, 2:246-248
- Mayadas TN, Cullere X. *Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decision*. **Trends Immunol** **2005**, 26:388-395
- McDowall A, Inwald D, Leitinger B, Jones A, Liesner R, Klein N, Hogg N. *A novel form of integrin dysfunction involving beta1, beta2, and beta3 integrins*. **J Clin Invest** **2003**, 111:51-60
- Monkley SJ, Zhou XH, Kinston SJ, Giblett SM, Hemmings L, Priddle H, Brown JE, Pritchard CA, Critchley DR, Fassler R. *Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage*. **Dev Dyn** **2000**, 219:560-574
- Moser M, Nieswandt B, Usser S, Pozgajova M, Fässler R. *Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation*. **Nat Med** **2008**, 14:325-330
- Moser M, Legate KR, Zent R, Fässler R. *The tail of integrins, talin and kindlins*. **Science** **2009**, 324:895-899
- Mould AP, Humphries MJ. *Regulation of integrin function through conformational complexity: not simple a knee-jerk reaction?* **Curr Opin Cell Biol** **2004**, 16:544-551
- Nussbaum C, Moser M, Sperandio M. *Leukocyte adhesion deficiency-III: when leukocytes cannot stop*. **Pediatr Res** **2010**, 67:339
- O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura RN, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH. *Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction*. **J Cell Biol** **1994**, 124:1047-1059
- O'Toole TE, Ylanne J, Culley BM. *Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain*. **J Biol Chem** **1995**, 270:8553-8558
- Olazabal IM, Caron E, May RC, Schilling K, Knecht DA, Machesky LM. *Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcgammaR phagocytosis*. **Curr Biol** **2002**, 12:1413-1418
- Pasquale EB, Maher PA, Singer SJ. *Talin is phosphorylated on tyrosine in chicken embryo fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus*. **Proc Nat Acad Sci** **1986**, 83:5507-5511
- Patil S, Jedsadayanmata A, Wencel-Drake JJ, Wang W, Knezevic I, Lam SCT. *Identification of a talin-binding site in the integrin beta subunit distinct from the NPLY regulatory motif of post-ligand binding functions*. **J Biol Chem** **1999**, 274:28575-28583
- Pasvolsky R, Feigelson SW, kilic SS, Simon AJ, Tal-Lapidot G, Grabovsky V, Crittenden JR, Amariglio N, Safran M, Graybiel AM, Rechavi G, Ben-Dor S, Etzioni A, Alon R. *A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap1 activator CalDAG-GEF1 in lymphocytes, neutrophils and platelets*. **J Exp Med** **2007**, 204:1571-1582
- Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. *Structure of the ERM protein moesina reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain*. **Cell** **2000**, 101:259-270
- Pfaff M, Liu S, Erle DJ, Ginsberg MH. *Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins*. **J Biol Chem** **1998**, 273:6104-6109
- Qin J, Vinogradova O, Plow EF. *Integrin bidirectional signaling: a molecular view*. **PLoS Biol** **2004**, 2:e169
- Sampath R, Gallagher PJ, Pavalko FM. *Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin*. **J Biol Chem** **1998**, 273:33588-33594
- Sánchez-Madrid F, Nagy JA, Robbins E, Simon P, Springer TA. *A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150, 95 molecule*. **J Exp Med** **1983**, 158:1785-1803
- Schwartz MA, Assoian RK. *Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases*

via cytoplasmic signaling pathways. **J Cell Sci** **2001**, 114:2553-2560

Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. *Integrin signaling: the platelet paradigm*. **Blood** **1998**, 91:2645-2657

Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, Kinashi T. *Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow*. **J cell Biol** **2003**, 161:417-427

Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, López JA. *Platelet glycoprotein Ibalph is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. **J Exp Med** **2000**, 192:193-204

Svensson L, Howarth K, McDowall A, Patzak I, Evans R, Ussar S, Moser M, Metin A, Fried M, Tomlison I, Hogg N. *Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation*. **Nat Med** **2009**, 15:306-312

Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA. *Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation*. **Science** **2003**, 302:103-106

Takagi J, Erickson HP, Springer TA. *C-terminal opening mimics "inside-out" activation of integrin $\alpha 5 \beta 1$* . **Nat Struct Biol** **2001**, 8:412-416

Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. *Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling*. **Cell** **2002**, 110:599-611

Tapley P, Horwitz A, Buck CA, Duggan K, Rohrschneider L. *Integrins isolated from Rous sarcoma-virus transformed chicken embryo fibroblasts*. **Oncogene** **1989**, 4:325-333

Thornton BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD. *Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18)*. **J Immunol** **1996**, 156:1235-1246

Tremuth L, Kreis S, Melchior C, Hoebeke J, Ronde P, Plancon S, Takeda K, Kieffer N. *A fluorescence cell biology approach to map the second integrin-binding site of talin to a 130-amino acid sequence within the rod domain*. **J Biol Chem** **2004**, 279:22258-22266

Tohyama Y, Katagiri K, Pardi R, Lu C, Springer TA, Kinashi T. *The critical cytoplasmic regions of the $\alpha L \beta 2$ integrin in Rap1-induced adhesion and migration*. **Mol Biol Cell** **2003**, 14:2570-2582

Turner CE, Pavalko FM, Burridge K. *The role of phosphorylation and limited proteolytic cleavage of talin and vinculin in the disruption of focal adhesion integrity*. **J Biol Chem** **1989**, 264:11938-11944

Ulmer TS, Yaspan B, Ginsberg MH, Campbell ID. *NMR analysis of structure and dynamics of the cytosolic tails of integrin $\alpha IIb \beta 3$ in aqueous solution*. **Biochemistry** **2001**, 40:7498-7508

Ulmer TS, Calderwood DA, Ginsberg MH, Campbell ID. *Domain-specific interactions of talin with the membrane-proximal region of the integrin $\beta 3$ subunit*. **Biochemistry** **2003**, 42:8307-8312

van der Flier A, Sonnenberg A. *Function and interactions of integrins*. **Cell Tissue Res** **2001**, 305:285-298

Vedder NB, Harlan JM. *Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to endothelium*. **J Clin Invest** **1988**, 81:676-682

Vinogradova O, Haas T, Plow EF, Qin J. *A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the αIIb subunit*. **Proc Nat Acad Sci USA** **2000**, 97:1450-1455

Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, Hu B, Haas TA, Plow EF, Qin J. *A structural mechanism of integrin $\alpha IIb \beta 3$ "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face*. **Cell** **2002**, 110:587-597

Walzog B, Schuppan D, Heimpel C, Hafezi-Moghadam A, Gaehtgens P, Ley K. *The leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) contributes to binding of human granulocytes to collagen*. **Exp cell Res** **1995**, 218:28-38

Wang R, Shattil SJ, Ambruso DR, Newman PJ. *Truncation of the cytoplasmic domain of $\beta 3$ in a variant form of Glanzmann thrombasthenia abrogates signaling through the integrin $\alpha IIb \beta 3$ complex*. **J Clin Invest** **1997**, 100:2393-2403

Weber C, Lu CF, Casasnovas JM, Springer TA. *Role of $\alpha L \beta 2$ integrin avidity in transendothelial chemotaxis of mononuclear cells*. **J Immunol** **1997**, 159:3968-3975

- Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH, Campbell ID. *Structural basis of integrin activation by talin*. **Cell** **2007**, 128:171-182
- Whitlock BB, Gardai S, Fadok V, Bratton D, Henson PM. *Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms*. **J Cell Biol** **2000**, 151:1305-1320
- Whittaker CA, Hynes RO. *Distribution and evolution of the von Willebrand/Integrin A domains: a widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere*. **Mol Biol Cell** **2002**, 13:3369-3387
- Wiedemann A, Patel JC, Lim J, Tsun A, van Kooyk Y, Caron E. *Two distinct cytoplasmic regions of the beta2 integrin chain regulate RhoA function during phagocytosis*. **J Cell Biol** **2006**, 172:1069-1079
- Wittchen ES, van Buul JD, Burrige K, Worthylake RA. *Trading spaces: Rap, Rac, and Rho as architects of transendothelial migration*. **Curr Opin Hematol** **2005**, 12:14-21
- Wright SD, Meyer BC. *Phorbol esters causes sequential activation and deactivation of complement receptors on polymorphonuclear leukocytes*. **J Immunol** **1986**, 136:1759-1764
- Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, Loike JD. *Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen*. **Proc Nat Acad Sci USA** **1988**, 85:7734-7738
- Wu C, Keivens VM, O'Toole TE, Ginsberg MH. *Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix*. **Cell** **1995**, 83:715-724
- Xi X, Bodnar RJ, Li Z, Lam SC, Du X. *Critical roles for the COOH-terminal NITY and RGT sequences of the integrin beta3 cytoplasmic domain in inside-out and outside-in signaling*. **J Cell Biol** **2003**, 162:329-339
- Xie J, Li R, Kotovouri P, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Arnaout MA, Nortamo P, Gahmberg CG. *Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain*. **J Immunol** **1995**, 155:3619-3628
- Xiong YM, Chen J, Zhang L. *Modulation of CD11b/CD18 adhesive activity by its extracellular, membrane-proximal regions*. **J Immunol** **2003**, 171:1042-1050
- Yan B, Calderwood DA, Yaspan B, Ginsberg MH. *Calpain cleavage promotes talin binding to the beta3 integrin cytoplasmic domain*. **J Biol Chem** **2001**, 276:28164-28170
- Zamir E, Geiger B. *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions*. **J Cell Sci** **2001**, 114:3583-3590

La pequeña GTPasa Rap1

- Abram CL, Lowell CA. *The ins and outs of leukocyte integrin signaling*. **Annu Rev Immunol** **2009**, 27:339-362
- Altschuler DL, Lapetina EG. *Mutational analysis of the cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation site of Rap1b*. **J Biol Chem** **1993**, 268:7527-7531
- Altschuler DL, Peterson SN, Ostrowski MC, Lapetina EG. *Cyclic AMP-dependent activation of Rap1b*. **J Biol Chem** **1995**, 270:10373-10376
- Arai A, Nosaka Y, Kanda E, Yamamoto K, Miyasaka N, Miura O. *Rap1 is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in regulation of beta1 integrin-mediated hematopoietic cell adhesion*. **J Biol Chem** **2001**, 276:10453-10462
- Asha H, de Ruiter ND, Wang MG, Hariharan IK. *The Rap1 GTPase functions as a regulator of morphogenesis in vivo*. **EMBO J** **1999**, 18:605-615
- Bender A, Pringle JR. *Multicopy suppression of the cdc24 budding defect in yeast by CDC42 and three newly identified genes including the ras-related gene RSR1*. **Proc Nat Acad Sci USA** **1989**, 86:9976-9980
- Berger G, Quarck R, Tenza D, Levy-Toledano S, de Gunzburg J, Cramer EM. *Ultrastructural localization of the small GTP-binding protein Rap1 in human platelets and megakaryocytes*. **Br J Haematol** **1994**, 88:372-382
- Bertoni A, Tadokoro S, Eto K, Pampori N, Parise LV, White GC, Shattil SJ. *Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin alpha IIb beta 3, and the actin cytoskeleton*. **J Biol Chem** **2002**, 277:25715-25721

- Boettner B, van Aelst L. *The Rap GTPase activator Drosophila PDZ-GEF regulates cell shape in epithelial migration and morphogenesis*. **Mol Cell Biol** **2007**, 27:7966-7980
- Bokoch GM, Quilliam LA, Bohl BP, Jesaitis AJ, Quinn MT. *Inhibition of Rap1A binding to cytochrome b558 of NADPH oxidase by phosphorylation of Rap1A*. **Science** **1991**, 254:1794-1796
- Bos JL, Franke B, M'Rabet L, Reedquist K, Zwartkruis F. *In search of function for the Ras-like GTPase Rap1*. **FEBS Letters** **1997**, 410:59-62
- Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA. *Rap1 signalling: adhering to new models*. **Nature Rev** **2001**, 2:369-377
- Bos JL. *Linking Rap to cell adhesion*. **Curr Opin Cell Biol** **2005**, 17:123-128
- Bottomley JR, Reynolds JS, Lockyer PJ, Cullen PJ. *Structural and functional analysis of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1(IP4BP) and GAP1(m)*. **Biochem Biophys Res Commun** **1998**, 250:143-149
- Boussiotis VA, Freeman GJ, Berezovskaya A, Barber DL, Nadler LM. *Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1*. **Science** **1997**, 278:124-128
- Caron E, Self AJ, Hall A. *The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin α M β 2 by LPS and other inflammatory mediators*. **Curr Biol** **2000**, 10:974-978
- Caron E. *Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges*. **J Cell Sci** **2003**, 116:435-440
- Chant J, Herskowitz I. *Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway*. **Cell** **1991**, 65:1203-1212
- Chrzanowska-Wodnicka M, Smyth SS, Schoenwaelder SM, Fischer TH, White GC. *Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice*. **J Clin Invest** **2005**, 115:680-687
- Cook SJ, Rubinfeld B, Albert I, McCormick F. *RapV12 antagonizes ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts*. **EMBO J** **1993**, 12:3475-3485
- Critchley DR. *Genetic, biochemical and structural approaches to talin function*. **Biochem Soc Trans** **2005**, 33:1308-1312
- Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD, Housman DE, Graybiel AM. *CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation*. **Nat Med** **2004**, 10:982-986
- Cullen PJ, Hsuan JJ, Truong O, Letcher AJ, Jackson TR, Dawson AP, Irvine RF. *Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P₄-binding protein as a member of the GAP1 family*. **Nature** **1995**, 376:527-530
- de Bruyn KM, Rangarajan S, Reedquist KA, Figdor CG, Bos JL. *The small GTPase Rap1 is required for Mn²⁺- and antibody-induced LFA-1- and VLA-4-mediated adhesion*. **J Biol Chem** **2002**, 277:29468-29476
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. *Epac is a Rap1 guanine-nucleotide exchange factor directly activated by cyclic AMP*. **Nature** **1998**, 396:474-477
- de Rooij J, Boenink N, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL. *PDZ-GEF1, a guanine nucleotide exchange factor specific for Rap1 and Rap2*. **J Biol Chem** **1999**, 274:38125-38130
- Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC. *RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs*. **Science** **1998**, 280: 1082-1086
- Enserink JM, Price LS, Mehti T, Mahic M, Sonnenberg A, Bos JL, Tasken K. *The cAMP-Epac-Rap1 pathway regulates cell spreading and cell adhesion to laminin-5 through the α 3 β 1 integrin but not the α 6 β 4 integrin*. **J Biol Chem** **2004**, 279:44889-44896
- Fam NP, Fan WT, Wang Z, Zhang LJ, Chen H, Moran MF. *Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras*. **Mol Cell Biol** **1997**, 17:1396-1406
- Farnsworth CL, Freshney NW, Rosen LB, Ghosh A, Greenberg ME, Feig LA. *Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF*. **Nature** **1995**, 376:524-527
- Farrell FX, Ohmstede CA, Reep BR, Lapetina EG. *cDNA sequence of a new ras-related gene (rap2b)*

isolated from human platelets with sequence homology to rap2. **Nucleic Acids Res** **1990**, 18:4281

Franke B, Akkerman JW, Bos JL. *Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets.* **EMBO J** **1997**, 16:252-259

Franke B, van Triest M, van Bruijn KM, van Willigen G, Nieuwenhuis HK, Negrier C, Akkerman JW, Bos JL. *Sequential regulation of the small GTPase Rap1 in human platelets.* **Mol Cell Biol** **2000**, 20:779-785

Frech M, John J, Pizon V, Chardin P, Tavitian A, Clark R, McCormick F, Wittinghofer A. *Inhibition of GTPase activating protein stimulation of Ras-p21 GTPase by the Krev-1 gene product.* **Science** **1990**, 249:169-171

Gao Q, Srinivasan S, Boyer SN, Wazer DE, Band V. *The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation.* **Mol Cell Biol** **1999**, 19:733-744

García-Álvarez B, de Pereda JM, Calderwood DA, Ulmer TS, Critchley D, Campbell ID, Ginsberg MH, Liddington RC. *Structural determinants of integrin recognition by talin.* **Mol Cell** **2003**, 11:49-58

Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M. *The phagosome proteome: insight into phagosome functions.* **J Cell Biol** **2001**, 152:165-180

Gotoh T, Hattori S, Nakamura S, Kitayama H, Noda M, Takai , Kaibuchi K, Matsui H, Hatase O, Takahashi H, Kurata T, Matsuda M. *Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G.* **Mol Cell Biol** **1995**, 15:6746-6753

Gotoh T, Niino Y, Tokuda M, Hatase O, Nakamura S, Matsuda M, Hattori S. *Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor.* **J Biol Chem** **1997**, 272:18602-18607

Han J, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, Calderwood DA, Puzon-McLaughlin W, Lafuente EM, Boussiotis VA, Shattil SJ, Ginsberg MH. *Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin α IIb β 3.* **Curr Biol** **2006**, 16:1796-1806

Hariharan IK, Carthew RW, Rubin GM. *The Drosophila roughened mutation: Activation of a rap*

homolog disrupts eye development and interferes with cell determination. **Cell** **1991**, 67:717-722

Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. *The leukocyte integrins.* **J Biol Chem** **2000**, 275:23409-23412

Hoshijima M, Kikuchi A, Kawata M, Ohmori T, Hashimoto E, Yamamura H, Takai Y. *Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase of a human platelet Mr 22,000 GTP-binding protein (smg p21) having the same putative effector domain as the ras gene products.* **Biochem Biophys Res Commun** **1988**, 157:851-860

Hughes PE, Pfaff M. *Integrin affinity modulation.* **Trends Cell Biol** **1998**, 8:359-364

Ichiba T, Kuraishi Y, Sakai O, Nagata S, Groffen J, Kurata T, Hattori S, Matsuda M. *Enhancement of guanine-nucleotide exchange activity of C3G for Rap1 by the expression of Crk, CrkL and Grb2.* **J Biol Chem** **1997**, 272:22215-22220

Janoueix-Lerosey I, Pasheva E, de Tand MF, Tavitian A, de Gunzburg J. *Identification of a specific effector of the small GTP-binding protein Rap2.* **Eur J Biochem** **1998**, 252:290-298

Jenzora A, Behrendt B, Small JV, Wehland J, Stradal TE. *PREL1 provides a link from Ras signaling to the actin cytoskeleton via Ena/VASP proteins.* **FEBS Lett** **2005**, 579:455-463

Jeon TJ, Lee DJ, Merlot S, Weeks G, Firtel RA. *Rap1 controls cell adhesion and cell motility through the regulation of myosin II.* **J Cell Biol** **2007**, 176:1021-1033

Kang PJ, Sanson A, Lee B, Park HO. *A GDP/GTP exchange factor involved in linking a spatial landmark to cell polarity.* **Science** **2001**, 292:1376-1378

Katagiri K, Hattori M, Minato N, Irie S, Takatsu K, Kinashi T. *Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase.* **Mol Cell Biol** **2000**, 20:1956-1969

Katagiri K, Hattori M, Minato N, Kinashi T. *Rap1 functions as a key regulator of T-cell and antigen-presenting cell interactions and modulates T cell responses.* **Mol Cell Biol** **2002**, 22:1001-1015

- Katagiri K, Maeda A, Shimonaka M, Kinashi T. *RapL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1.* **Nat Immunol** **2003**, 4:741-748
- Katagiri K, Ohnishi N, Kabashima K, Iyoda T, Takeda N, Shinkai Y, Inaba K, Kinashi T. *Crucial functions of the Rap1 effector molecule RapL in lymphocyte and dendritic cell trafficking.* **Nat Immunol** **2004**, 5:1045-1051
- Katagiri K, Imamura M, Kinashi T. *Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion.* **Nat Immunol** **2006**, 7:919-928
- Kawasaki H, Springett GM, Toki S, Canales JJ, Harlan P, Blumenstiel JP, Chen EJ, Bany IA, Mochizuki N, Ashbacher A, Marsuda M, Housman DE, Graybiel AM. *A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia.* **Proc Nat Acad Sci USA** **1998a**, 95:13278-13283
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. *A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1.* **Science** **1998b**, 282:2275-2279
- Kinashi T, Katagiri K. *Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule RapL.* **Immunol Lett** **2004**, 93:1-5
- Kinbara K, Goldfinger LE, Hansen M, Chou FL, Ginsberg MH. *Ras GTPases: integrins' friends or foes?* **Nat Rev Mol Cell Biol** **2003**, 4:767-776
- Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M. *A ras-related gene with transformation suppressor activity.* **Cell** **1989**, 56:77-84
- Kiyokawa E, Mochizuki N, Kurata T, Matsuda M. *Role of Crk oncogene product in physiologic signaling.* **Crit Rev Oncog** **1997**, 8:329-342
- Knox AL, Brown NH. *Rap1 GTPase regulation of adherens junction positioning and cell adhesion.* **Science** **2002**, 295:1285-1288
- Kooistra MR, Dube N, Bos JL. *Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation.* **J Cell Sci** **2007**, 120:17-22
- Kurachi H, Wada Y, Tsukamoto N, Maeda M, Kubota H, Hattori M, Iwai K, Minato N. *Human SPA-1 gene product selectively expressed in lymphoid tissues is a specific GTPase-activating protein for Rap1 and Rap2. Segregate expression profiles from a rap1GAP gene product.* **J Biol Chem** **1997**, 272:28081-28088
- Labadia ME, Bokoch GM, Huang CK. *The Rap1A protein enhances protein kinase C activity in vitro.* **Biochem Biophys Res Commun** **1993**, 195:1321-1326
- Lafuente EM, van Puijenbroeck AA, Krause M, Carman CV, Freeman GJ, Berezovskaya A, Constantine E, Springer TA, Gertler FB, Boussiotis VA. *RIAM, an Ena/VASP and profiling ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion.* **Dev Cell** **2004**, 7:585-595
- Lee HS, Lim CJ, Puzon-McLaughlin W, Shattil SJ, Ginsberg MH. *RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences.* **J Biol Chem** **2009**, 284:5119-5227
- Li Y, Yan J, De P, Chang HC, Yamauchi A, Christopherson KW, Paranevitana NC, Peng X, Kim C, Munugalavadla V, Kapur R, Chen H, Shou W, Stone JC, Kaplan MH, Dinanuer MC, Durden DL, Quilliam LA. *Rap1a null mice have altered myeloid functions suggesting distinct roles for the closely related Rap1a and 1b proteins.* **J Immunol** **2007**, 179:8322-8331
- Lim J, Wiedemann A, Tzircotis G, Monkley SJ, Critchley DR, Caron E. *An essential role for talin during alpha(M)beta(2)-mediated phagocytosis.* **Mol Biol Cell** **2007**, 18:976-985
- Lim J, Dupuy AG, Critchley DR, Caron E. *Rap1 controls activation of the alpha(M)beta(2) integrin in a talin-dependent manner.* **J Cell Biochem** **2010**, 111:999-1009
- Lim J, Hotchin NA, Caron E. *Ser756 of beta2 integrin controls Rap1 activity during inside-out activation of alphaMbeta2.* **Biochem J** **2011**, 437:461-467
- Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. *Integrin cytoplasmic domain-binding proteins.* **J Cell Sci** **2000**, 113:3563-3571
- Lockyer PJ, Bottomley JR, Reynolds JS, McNulty TJ, Venkateswarlu K, Potter BV, Dempsey CE, Cullen PJ. *Distinct subcellular localizations of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1IP4BP and GAP1m result from the GAP1IP4BP PH domain directing plasma membrane targeting.* **Curr Biol** **1997**, 7:1007-1010

- M'Rabet L, Coffey P, Zwartkruis F, Franke B, Segal AW, Koenderman L, Bos JL. *Activation of the small GTPase rap1 in human neutrophils*. **Blood** **1998**, 92:2133-2140
- Malinin NL, Plow EF, Byzova TV. *Kindlins in FERM adhesion*. **Blood** **2010**, 115:4011-4017
- Maly FE, Quilliam LA, Dorseuil O, Der CJ, Bokoch GM. *Activated or dominant inhibitory mutants of Rap1A decrease the oxidative burst of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes*. **J Biol Chem** **1994**, 269:18743-18746
- Maridonneau-Parini I, de Gunzburg J. *Association of rap1 and rap2 proteins with the specific granules of human neutrophils. Translocation to the plasma membrane during cell activation*. **J Biol Chem** **1992**, 267:6396-6402
- McLeod SJ, Ingham RJ, Bos JL, Kurasaki T, Gold MR. *Activation of the Rap1 GTPase by the B cell antigen receptor*. **J Biol Chem** **1998**, 273:29218-29223
- Ménasché G, Kliche S, Chen EJ, Stradal TE, Schraven B, Koretzky G. *RIAM links the ADAP/SKAP-55 signaling module to Rap1, facilitating T-cell-receptor-mediated integrin activation*. **Mol Cell Biol** **2007**, 27:4070-4081
- Mochizuki N, Ohba Y, Kiyokawa E, Kurata T, Murakami T, Ozaki T, Kitabatake A, Nagashima K, Matsuda M. *Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with Galphai*. **Nature** **1999**, 400:891-894
- Mochizuki N, Ohba Y, Kobayashi S, Otsuka N, Graybiel AM, Tanaka S, Matsuda M. *Crk activation of JNK via C3G and R-Ras*. **J Biol Chem** **2000**, 275:12667-12671
- Mor A, Wynne JP, Ahearn IM, Dustin ML, Du G, Phillips MR. *Phospholipase D1 regulates lymphocyte adhesion via upregulation of Rap1 at the plasma membrane*. **Mol Cell Biol** **2009**, 29:3297-3306
- Mulrooney JP, Hong T, Grabel LB. *Serine 785 phosphorylation of the beta1 cytoplasmic domain modulates beta1A-integrin-dependent functions*. **J Cell Sci** **2001**, 114:2525-2533
- Noda M. *Structures and functions of the K rev-1 transformation suppressor gene and its relatives*. **Biochim Biophys Acta** **1993a**, 1155:97-109
- Noda M. *Mechanism of reversion*. **FASEB J** **1993b**, 7:834-840
- Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Mayer BJ, Maki K, Miyazaki J, Matsuda M. *Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis*. **EMBO J** **2001**, 20:3333-3341
- Ohmstede CA, Farrell FX, Reep BR, Clemetson KJ, Lapetina EG. *RAP2B: a RAS-related GTP-binding protein from platelets*. **Proc Nat Acad Sci USA** **1990**, 87:6527-6531
- Ohtsuka T, Shimizu K, Yamamori B, Kuroda S, Takai Y. *Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein*. **J Biol Chem** **1996**, 271:1258-1261
- Okada S, Matsuda M, Anafi M, Pawson T, Pessin JE. *Insulin regulates the dynamic balance between Ras and Rap1 signaling by coordinating the assembly states of the Grb2-SOS and Crk II-C3G complexes*. **EMBO J** **1998**, 17:2554-2565
- Patsoukis N, Lafuente EM, Meraner P, Kim J, Dombkowski D, Li L, Boussiotis VA. *RIAM regulates the cytoskeletal distribution and activation of PLCγ1 in T cells*. **Sci Signal** **2009**, 2:ra79
- Pizon V, Chardin P, Lerosey I, Olofsson B, Tavittian A. *Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the "effector" region*. **Oncogene** **1988a**, 3:201-204
- Pizon V, Lerosey I, Chardin P, Tavittian A. *Nucleotide sequence of a human cDNA encoding a ras-related protein (rap1B)*. **Nucleic Acids Res** **1988b**, 16:7719
- Pizon V, Desjardins M, Bucci C, Parton RG, Zenial M. *Association of Rap1a and Rap1b with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex*. **J Cell Sci** **1994**, 107:1661-1670
- Price LS, Hajdo-Milasnovic A, Zhao J, Zwartkruis FJ, Collard JG, Bos JL. *Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion*. **J Biol Chem** **2004**, 279:35127-35132
- Quinn MT, Mullen ML, Jesaitis AJ, Linner JG. *Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559*. **Blood** **1992**, 79:1563-1573
- Rebstein PJ, Cardelli J, Weeks G, Spiegelman GB. *Mutational analysis of the role of Rap1 in regulating*

cytoskeletal function in *Dictyostelium*. **Exp Cell Res** **1997**, 231:276-283

Reedquist KA, Bos JL. Costimulation through CD28 suppresses T cell receptor-dependent activation of the Ras-like small GTPase Rap1 in human T lymphocytes. **J Biol Chem** **1998**, 273:4944-4949

Reedquist KA, Ross E, Koop EA, Wolthuis RM, Zwartkruis FJ, van Kooyk Y, Salmon M, Buckley CD, Bos JL. The small GTPase Rap1 mediates CD31-induced integrin adhesion. **J Cell Biol** **2000**, 148:1151-1158

Reuther GW, Der CJ. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. **Curr Opin Cell Biol** **2000**, 12:157-165

Ribeiro-Neto F, Urbani J, Lemee N, Lou L, Altschuler DL. On the mitogenic properties of Rap1b: cAMP-induced G(1)/S entry requires activated and phosphorylated Rap1b. **Proc Nat Acad Sci USA** **2002**, 12:157-165

Rubinfeld B, Munemitsu S, Clark R, Conroy L, Watt K, Crosier WJ, McCormick F, Polakis P. Molecular cloning of a GTPase activating protein specific for the Krev-1 protein p21rap1. **Cell** **1991**, 65:1033-1042

Sakkab D, Lewitzky M, Posern G, Schaeper U, Sachs M, Birchmeier W, Feller SM. Signaling of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF) to the small GTPase Rap1 via the large docking protein Gab1 and the adapter protein CrkL. **J Biol Chem** **2000**, 275:10772-10778

Schmidt A, Caron E, Hall A. Lipopolysaccharide-induced activation of beta2-integrin function in macrophages requires Irak kinase activity, p38 mitogen-activated protein kinase, and the Rap1 GTPase. **Mol Cell Biol** **2001**, 21:438-448

Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeletal and integrins. **Curr Opin Cell Biol** **1999**, 11:274-286

Seastone DJ, Zhang L, Buczynski G, Rebstein P, Weeks G, Spiegelman G, Cardelli J. The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the Phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. **Mol Biol Cell** **1999**, 10:393-406

Sebzda E, Bracke M, Tugal T, Hogg N, Cantrell DA. Rap1A positively regulates T cells via integrin

activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. **Nat Immunol** **2002**, 3:251-258

Shattil SJ. The beta3 integrin cytoplasmic tail: protein scaffold and control freak. **J Thromb Haemost** **2009**, 7:210-213

Stork PJ, Dillon TJ. Multiple roles of Rap1 in hematopoietic cells: complementary versus antagonistic functions. **Blood** **2005**, 106:2952-2961

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. **Physiol Rev** **2001**, 81:153-208

Torti M, Lapetina EG. Role of Rap1B and p21ras GTPase-activating protein in the regulation of phospholipase C-gamma 1 in human platelets. **Proc Nat Acad Sci USA** **1992**, 89:7796-7800

Tsukamoto N, Hattori M, Yang H, Bos JL, Minato N. Rap1 GTPase-activating protein SPA-1 negatively regulates cell adhesion. **J Biol Chem** **1999**, 274:18463-18469

van den Berghe N, Cool RH, Horn G, Wittinghofer A. Biochemical characterization of C3G: an exchange factor that discriminates between Rap1 and Rap2 and is not inhibited by Rap1A (S17N). **Oncogene** **1997**, 15:845-850

van Kooyk Y, Figdor CG. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. **Curr Opin Cell Biol** **2000**, 12:542-547

Watanabe N, Bodin L, Pandey M, Krause M, Coughlin S, Boussiotis VA, Ginsberg MH, Shattil SJ. Mechanisms and consequences of agonist-induced talin recruitment to platelet integrin alphaIIb beta3. **J Cell Biol** **2008**, 181:1211-1222

Wiedemann A, Patel JC, Lim J, Tsun A, van Kooyk Y, Caron E. Two distinct cytoplasmic regions of the beta2 integrin chain regulate RhoA function during phagocytosis. **J Cell Biol** **2006**, 172:1069-1079

Wienecke R, Konig A, DeClue JE. Identification of tuberlin, the tuberous sclerosis-2 product. Tuberlin possesses specific Rap1GAP activity. **J Biol Chem** **1995**, 270:16409-16414

Wienecke R, Maize JC, Shoarinejad JCJ, Vass WC, Reed J, Bonifacio JS, Resau JH, de Gunzburg J, Yeung RS, DeClue JE. Co-localization of the TSC2 product tuberlin with its target Rap1 in the Golgi apparatus. **Oncogene** **1996**, 13:913-923

Wittchen ES, Aghajanian A, Burrridge K. *Isoform-specific differences between Rap1A and Rap1B GTPases in the formation of endothelial junctions. Small GTPases* **2011**, 2:65-76

Worth DC, Hodivala-Dilke K, Robinson SD, King SJ, Morton PE, Gertler FB, Humphries MJ, Parsons M. *Alpha V beta3 integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration. J Cell Biol* **2010**, 189:369-383

Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, Tobiume M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K, Matsuda M. *CalDAG-GEF III activation of Ras, R-Ras, and Rap1. J Biol Chem* **2000**, 275:25488-25493

Zwartkruis FJT, Wolthuis RMF, Nabben NMJM, Franke B, Bos JL. *Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signaling. EMBO J* **1998**, 17:5905-5912

Zwartkruis FJT, Bos JL. *Ras and Rap1 as highly related small GTPases. Exp Cell Res* **1999**, 253:157-165

MATERIALES Y MÉTODOS

Fleck RA, Athwal H, Bygraves JA, Hockley DJ, Feavers IM, Stacey GN. *Optimization of NB-4 and HL-60 differentiation for use in opsonophagocytosis assays. In vitro Cell Dev Biol Anim* **2003**, 39:235-242

Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. *Characterization of the continuous differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. Blood* **1979**, 54:713-733

He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. *A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Nat Acad Sci USA* **1998**, 95:2509-2514

Lafuente EM, van Puijenbroeck AA, Krause M, Carman CV, Freeman GJ, Berezovskaya A, Constantine E, Springer TA, Gertler FB, Boussiotis VA. *RIAM, an Ena/VASP and profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion. Dev Cell* **2004**, 7:585-595

Olazabal IM, Caron E, May RC, Schilling K, Knecht DA, Machesky LM. *Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not*

FcgammaR phagocytosis. Curr Biol **2002**, 12:1413-1418

Pricop I, Salmon JE, Edberg JC, Beavis AJ. *Flow cytometric quantitation of attachment and phagocytosis in phenotypically-defined subpopulations of cells using PKH26-labeled Fc gamma R-specific probes. J Immunol Methods* **1997**, 205:55-65

Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, van Parijs L. *A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. Nat Genet* **2003**, 33:401-406

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int J Cancer* **1980**, 26:171-176

RESULTADOS

Bertoni A, Tadokoro S, Eto K, Pampori N, Parise LV, White GC, Shattil SJ. *Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin alpha IIb beta 3, and the actin cytoskeleton. J Biol Chem* **2002**, 277:25715-25721

Diamond MS, Garcia-Angular, Bickford JK, Corbi AL, S TA. *The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. J Cell Biol* **1993**, 120:1031-1043

Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. *Characterization of the continuous differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. Blood* **1979**, 54:713-733

Han J, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, Calderwood DA, Puzon-McLaughlin W, Lafuente EM, Boussiotis VA, Shattil SJ, Ginsberg MH. *Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin alphaIIb beta3. Curr Biol* **2006**, 16:1796-1806

Inagaki T, Suzuki S, Miyamt T, Takeda T, Yamashita K, Komatsu A, Yamauchi K, Hashizume K. *The retinoic acid-responsive proline-rich protein is identified in*

promyeloleukemic HL-60 cells. **J Biol Chem** 2003, 278:51685-51692

Katagiri K, Hattori M, Minato N, Irie S, Takatsu K, Kinashi T. *Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase.* **Mol Cell Biol** 2000, 20:1956-1969

Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. *Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors.* **Science** 1989, 245:1238-1241

Lafuente EM, van Puijenbroeck AA, Krause M, Carman CV, Freeman GJ, Berezovskaya A, Constantine E, Springer TA, Gertler FB, Boussiotis VA. *RIAM, an Ena/VASP and profiling ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion.* **Dev Cell** 2004, 7:585-595

Lomakina EB, Waugh RE. *Micromechanical Tests of Adhesion Dynamics between Neutrophils and Immobilized ICAM-1.* **Biophys J** 2004, 86:1223-1233.

Oxvig C, Lu C, Springer TA. *Conformational changes in tertiary structure near the ligand binding site of an integrin I domain.* **Proc Nat Acad Sci USA** 1999, 96:2215-2220

Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, van Parijs L. *A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference.* **Nat Genet** 2003, 33:401-406

Sebzda E, Bracke M, Tugal T, Hogg N, Cantrell DA. *Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling.* **Nat Immunol** 2002, 3:251-258

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).* **Int J Cancer** 1980, 26:171-176

Watanabe N, Bodin L, Pandey M, Krause M, Coughlin S, Boussiotis VA, Ginsberg MH, Shattil SJ. *Mechanisms and consequences of agonist-induced talin recruitment to platelet integrin α IIb β 3.* **J Cell Biol** 2008, 181:1211-1222

Woska JR, Morelock MM, Jeanfavre DD, Caviness GO, Bormann BJ, Rothlein R. *Molecular comparison*

of soluble intercellular adhesion molecule (sICAM)-1 and sICAM-3 binding to lymphocyte function-associated antigen-1. **J Biol Chem** 1998, 273:4725-4733

DISCUSIÓN

Alterai AM, Zhelev DV. *Transient increase of free cytosolic calcium during neutrophil motility responses.* **J Cell Sci** 1997, 110:1967-1977

Bergmeier W, Goerge T, Wang HW, Crittenden JR, Baldwin AC, Cifuni SM, Housman DE, Graybiel AM, Wagner DD. *Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III.* **J Clin Invest** 2007, 117:1699-1707

Chandler D, Meusel G, Schumaker E, Stapleton C. *FMLP-induced enzyme release from neutrophils: a role for intracellular calcium.* **Am J Physiol** 1983, 245:C196-202

Chow CW, Grinstein S, Rotstein OD. *Signaling events in monocytes and macrophages.* **New Horiz** 1995, 3:342-351

Critchley DR. *Genetic, biochemical and structural approaches to talin function.* **Biochem Soc Trans** 2005, 33:1308-1312

Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD, Housman DE, Graybiel AM. *CalDAG-GEF I integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation.* **Nat Med** 2004, 10:982-986

Desjardins M, Houde M, Gagnon E. *Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity.* **Immunol Rev** 2005, 207:158-165

Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Bertoni A, Stuhlmann H, Nakano T, Leavitt AD, Shattil SJ. *Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling.* **Proc Nat Acad Sci USA** 2002, 99:12819:12824

Goksoy E, Ma YQ, Wang X, Kong X, Perera D, Plow EF, Qin J. *Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation.* **Mol Cell** 2008, 31:124-133

Han J, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, Calderwood DA, Puzon-McLaughlin W, Lafuente EM,

- Boussiotis VA, Shattil SJ, Ginsberg MH. *Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin α IIb β 3*. **Curr Biol** **2006**, 16:1796-1806
- Hudmon A, Schulman H. *Structure-function of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II*. **Biochem J** **2002**, 364:593-611
- Jenzora A, Behrendt B, Small JV, Wehland J, Stradal TE. *PREL1 provides a link from Ras signaling to the actin cytoskeleton via Ena/VASP proteins*. **FEBS Lett** **2005**, 579:455-463
- Kinashi T, Katagiri K. *Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule RapL*. **Immunol Lett** **2004**, 93:1-5
- Kinashi T, Katagiri K. *Regulation of immune cell adhesion and migration regulator of adhesion and cell polymerization enriched in lymphoid tissues*. **Immunology** **2005**, 116:164-161
- Krause M, Leslie JD, Stewart M, Lafuente EM, Valderrama F, Jagannathan R, Strasser GA, Robinson DA, Liu H, Way M, Yaffe MB, Boussiotis VA, Gertler FB. *Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics*. **Dev Cell** **2004**, 7:571-583
- Lafuente EM, van Puijenbroeck AA, Krause M, Carman CV, Freeman GJ, Berezovskaya A, Constantine E, Springer TA, Gertler FB, Boussiotis VA. *RIAM, an Ena/VASP and profiling ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion*. **Dev Cell** **2004**, 7:585-595
- Lee HS, Lim CJ, Puzon-McLaughlin W, Shattil SJ, Ginsberg MH. *RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences*. **J Biol Chem** **2009**, 284:5119-5227
- Lim J, Dupuy AG, Critchley DR, Caron E. *Rap1 controls activation of the α (M) β (2) integrin in a talin-dependent manner*. **J Cell Biochem** **2010**, 111:999-1009
- Lim J, Hotchin NA, Caron E. *Ser756 of β 2 integrin controls Rap1 activity during inside-out activation of α M β 2*. **Biochem J** **2011**, 437:461-467
- Lyulcheva E, Taylor E, Michael M, Vehlow A, Tan S, Fletcher A, Krause M, Bennett D. *Drosophila p100 and its mammalian ortholog lamellipodin activate serum response factor and promote cell proliferation*. **Dev Cell** **2008**, 15:680-690
- Martel V, Racaud-Sultan C, Dupe S, Marie C, Paulhe F, Galmiche A, Block MR, Albiges-Rizo C. *Conformation, localization and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides*. **J Biol Chem** **2001**, 276:21217-21227
- Ménasché G, Kliche S, Chen EJ, Stradal TE, Schraven B, Koretzky G. *RIAM links the ADAP/SKAP-55 signaling module to Rap1, facilitating T-cell-receptor-mediated integrin activation*. **Mol Cell Biol** **2007**, 27:4070-4081
- Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV. *EPAC-mediated activation of phospholipase C plays a critical role in β -adrenergic receptor dependent enhancement of Ca^{2+} mobilization in cardiac myocytes*. **J Biol Chem** **2007**, 282:5488-5495
- Pasvolosky R, Feigelson SW, Kilic SS, Simon AJ, Tal-Lapidot G, Grabovsky V, Crittenden JR, Amariglio N, Safran M, Graybiel AM, Rechavi G, Ben-Dor S, Etzioni A, Alon R. *A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEFI in lymphocytes, neutrophils and platelets*. **J Exp Med** **2007**, 204:1571-1582
- Pereira L, Métrich M, Fernández-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fismeischter R, Richard S, Bénitah JP, Lezoualch F, Gómez AM. *The cAMP binding protein Epac modulates Ca^{2+} sparks by a Ca^{2+} /calmodulin kinase signaling pathway in rat cardiac myocytes*. **J Physiol** **2007**, 583:685-694
- Poggi A, Carosio R, Rubartelli A, Zocchi MR. *β 3-mediated engulfment of apoptotic tumour cells by dendritic cells is dependent on CaMKII: inhibition by HIV-1 Tat*. **J Leukoc Biol** **2002**, 71:531-537
- Sawyer DW, Sullivan JA, Mandell GL. *Intracellular free calcium localization in neutrophils during phagocytosis*. **Science** **1985**, 230:663-666
- Schmidt M, Evellin S, Weernink PA, von Dorp F, Rehmann H, Lomasney JW, Jakobs KH. *A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase*. **Nat Cell Biol** **2001**, 3:1020-1024

Underhill DM, Ozinsky A. *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. **Annu Rev Immunol** **2002**, 20:825-852

Worth DC, Hodivala-Dilke K, Robinson SD, King SJ, Morton PE, Gertler FB, Humphries MJ, Parsons M. *Alpha V beta3 integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration*. **J Cell Biol** **2010**, 189:369-383

ANEXOS

Hernández-Varas P, Coló GP, Bartolomé RA, Paterson A, Medraño-Fernández I, Arellano-Sánchez N, Cabañas C, Sánchez-Mateos P, Lafuente EM, Boussiotis VA, Strömblad S, Teixidó J. *Rap-1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM) protein controls invasión and growth of melanoma cells*. **J Biol Chem** **2011**, 286:18492-18504

Lafuente EM, Patsoukis N, Medraño-Fernández I, Boussiotis VA. *RIAM*. **UCSD Nature Molecule Pages** **2010**

ANEXO

PUBLICACIÓN (2010) desarrollada en colaboración con el grupo de la Dra. Vassiliki A. Boussiotis del Dana Farber Institute, Boston – MA (USA).

PUBLICACIÓN (2011) desarrollada en colaboración con el grupo del Dr. Joaquín Teixidó del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC), c/Ramiro de Maeztu, 9, 28040 – Madrid (España).

PUBLICACIÓN desarrollada durante el periodo doctoral (en fase de presentación para publicación).

RIAM

Esther M Lafuente¹, Nikolaos Patsoukis², Iria Medrano-Fernandez³, Vassiliki A Boussiotis⁴

¹F. Medicina, Microbiología I, Universidad Complutense de Madrid, 28040, ES. ²Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center-Harvard Institutes of Medicine, MA 02215, US. ³Microbiología I, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, ES.

⁴Hematology-Oncology and Cancer Biology, Beth Israel Deaconess Medical Center, MA 02215, US.

Correspondence should be addressed to Vassiliki A Boussiotis: vboussio@bidmc.harvard.edu

Protein Function

Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM), an effector of the small guanosine triphosphatase (GTPase) Rap1, is a member of the MIG-10/RIAM/Lpd (MRL) family of adaptor molecules, which also includes lamellipodin (Lpd) and its *Caenorhabditis elegans* ortholog, abnormal cell migration protein 10 (MIG-10). Phylogenetic analysis showed that the MRL proteins are conserved during evolution but *Drosophila* and *C. elegans* only have one gene encoding for MRL proteins (Lafuente *et al.* 2004). Each of these proteins has a putative coiled-coil region downstream central Ras-association (RA) and pleckstrin homology (PH) domains, and a proline-rich C-terminal region with multiple FPPPP motifs that interact with the ENA-VASP homology 1 (EVH1) domains of the actin regulatory proteins *Drosophila* enabled (ENA) and vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), and multiple XPPPP motifs that interact with profilin (Manser *et al.* 1997; Lafuente *et al.* 2004; Krause *et al.* 2004). The N-terminal structure of RIAM differs from the other family members and contains a short, proline-rich N-terminal region with two putative EVH1 binding sites and one additional coiled-coil domain. RIAM and Lpd share conserved RA and PH domains, whereas the N-terminal and C-terminal regions are more divergent (29.1% amino acid identity in the N-terminal and 23.2% amino acid identity in the C-terminal). In addition, the C-terminal of Lpd is 500 amino acids longer than that of RIAM's (Lafuente *et al.* 2004; Krause *et al.* 2004).

Mig-10, the *C. elegans* ortholog of the *MRL* genes was initially identified as a mutation involved in neuronal cell migration defects during *C. elegans* embryogenesis. The *mig-10* gene is required for the long-range anteroposterior migration of the two canal-associated neurons (CANs), anterior lateral microtubule (ALM) cells and hermaphrodite-specific neurons (HSNs), and for proper development of the excretory canals (Manser and Wood 1990). Subsequent cloning of the gene indicated that *mig-10* could encode two proteins, which contained an RA domain, a PH domain and a proline-rich region. The predicted MIG-10 proteins shared a large region of similarity with the growth factor receptor-bound (Grb) proteins Grb7 and Grb10 but did not contain an Src homology 2 (SH2) domain that is typically present in the Grb family of proteins (Manser *et al.* 1997). It is now clear that MIG-10 is a member of the MRL protein family and that *mig-10* is the *C. elegans* ortholog of RIAM and Lpd (Lafuente *et al.* 2004).

RIAM was first identified as a binding partner of amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 (APBB1) – also known as neural Fe65 protein – and was termed amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein (APBB1IP). This association is mediated via the WW (tryptophan-tryptophan) domain of Fe65 interacting with the proline-rich regions of RIAM (Ermeikova *et al.* 1997). In an independent study, RIAM was identified as a protein whose expression was induced in response to all-*trans* retinoic acid (ATRA) in the promyeloleukemic HL-60 cell line. This protein was named retinoic acid-responsive proline-rich protein 1 (RARP-1) and was proposed to be related to growth arrest. This study reported that forced expression of RIAM in various cell types suppressed transactivation through activator protein 1 (AP-1) and serum response element (SRE), but not through the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element, and the proline-rich regions of RIAM were required for this effect (Inagaki *et al.* 2003). A later search for Rap1-GTP interacting molecules in T cells isolated the gene and it was named *RIAM* (Lafuente *et al.* 2004). This study identified that *RIAM* defines a new class of adaptor molecules and determined that overexpression of *RIAM* in Jurkat T cells and human embryonic kidney 293 (HEK293) cells resulted in increased cell

Rap1-GTP-interacting Adaptor Molecule (RIAM) Protein Controls Invasion and Growth of Melanoma Cells^{*[S]}

Received for publication, September 29, 2010, and in revised form, March 25, 2011 Published, JBC Papers in Press, March 26, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.189811

Pablo Hernández-Varas^{‡1}, Georgina P. Coló^{‡1}, Ruben A. Bartolomé[‡], Andrew Paterson[§], Iria Medraño-Fernández[¶], Nohemí Arellano-Sánchez[‡], Carlos Cabañas^{||}, Paloma Sánchez-Mateos^{**}, Esther M. Lafuente[¶], Vassiliki A. Boussiotis^{‡‡}, Staffan Strömblad[§], and Joaquin Teixido^{‡2}

From the [‡]Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, 28040 Madrid, Spain, the [§]Center for Biosciences, Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, SE-141 83 Huddinge, Sweden, the [¶]Facultad de Medicina, Department of Microbiology and Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Universidad Complutense de Madrid, 28041 Madrid, Spain, the ^{||}Centro de Biología Molecular, 28049 Madrid, Spain, the ^{**}Servicio de Inmuno-Oncología, Hospital Universitario Gregorio Marañón, 28007 Madrid, Spain, and the ^{‡‡}Division of Hematology and Oncology, Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

The Mig-10/RIAM/lamellipodin (MRL) family member Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM) interacts with active Rap1, a small GTPase that is frequently activated in tumors such as melanoma and prostate cancer. We show here that RIAM is expressed in metastatic human melanoma cells and that both RIAM and Rap1 are required for BLM melanoma cell invasion. RIAM silencing in melanoma cells led to inhibition of tumor growth and to delayed metastasis in a severe combined immunodeficiency xenograft model. Defective invasion of RIAM-silenced melanoma cells arose from impairment in persistent cell migration directionality, which was associated with deficient activation of a Vav2-RhoA-ROCK-myosin light chain pathway. Expression of constitutively active Vav2 and RhoA in cells depleted for RIAM partially rescued their invasion, indicating that Vav2 and RhoA mediate RIAM function. These results suggest that inhibition of cell invasion in RIAM-silenced melanoma cells is likely based on altered cell contractility and cell polarization. Furthermore, we show that RIAM depletion reduces β 1 integrin-dependent melanoma cell adhesion, which correlates with decreased activation of both Erk1/2 MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase, two central molecules controlling cell growth and cell survival. In addition to causing inhibition of cell proliferation, RIAM silencing led to higher susceptibility to cell apoptosis. Together, these data suggest that defective activation of these kinases in RIAM-silenced cells could account for inhibition of melanoma cell growth and that RIAM might contribute to the dissemination of melanoma cells.

Rap1 belongs to the Ras family of small GTPases, which are molecular switches that couple extracellular signals with a variety of cellular responses, such as cell proliferation and survival, cell adhesion, and cell polarity (1–3). Rap1 activation is regulated by guanine-nucleotide exchange factors, which stimulate exchange of bound GDP by GTP, and by GTPase-activating proteins, which promote GTP hydrolysis (4). The GTP-associated form of Rap1 is responsible for interaction with its effectors, which then transmit the signaling necessary to generate cell responses.

Rap1-GTP-interacting adaptor molecule (RIAM)³ is an effector protein for Rap1 that belongs to the MRL (Mig-10/RIAM/Lamellipodin) family of adaptor proteins (5). RIAM contains an N-terminal coiled-coil region, a central Ras association, and pleckstrin homology domains, a C-terminal region rich in prolines, as well as several FPPP motifs with the potential of interacting with ENA-VASP proteins. RIAM is broadly expressed, and it was first characterized as a molecule that promotes Rap1-dependent β 1 and β 2 integrin activation on T lymphocytes (5). Subsequent work demonstrated that Rap1-RIAM association favors talin targeting to the plasma membrane through direct talin interaction with an N-terminal segment of RIAM, a process that contributed to integrin activation (6, 7). Furthermore, RIAM co-localizes with talin in lamellipodia (6), representing a mechanism that could help to localize activated integrins at these cell membrane protrusions. In addition, recent data indicated that an MRL ortholog in *Drosophila* called *pico* is required for tissue growth (8), therefore widening the functional potential of MRL proteins in the control of different cellular responses.

RIAM also regulates T cell receptor-mediated signaling. RIAM is recruited to immunological synapses during T cell-antigen presenting cell interactions (9). Notably, the T cell kinases ZAP-70, Fyn, and Lck can associate to RIAM and promote its tyrosine phosphorylation (10). Moreover, RIAM silencing leads to impairment in Ras-dependent signaling and

^{*} This work was supported by Grants SAF2008-00479 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (to J. T.), Grants SAF2007-60578 and CCG08-UCM/SAL-4259 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (to E. M. L.), Grant RETICS RD06/0020/0011 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (to J. T.), Grant BFU2007-66443 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (to C. C.), a 2006 Grant from the Fundación Ramón Areces (to P. S.-M.), Grant EU-FP7-MetaFight, European Union HEALTH-2007-201862 (to J. T. and S. S.), a grant from the Swedish Cancer Society and the Swedish Research Council (to S. S.), Grant 2RO1 AI43552 (to V. A. B.), and by a grant from the Fundación de Investigación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer (to R. A. B.).

^[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S8 and Videos 1–4.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-8373112; Fax: 34-91-5360432; E-mail: joaquin@ cib.csic.es.

³ The abbreviations used are: RIAM, Rap1-GTP-interacting adaptor molecule; MRL, Mig-10/RIAM/Lamellipodin; CA, constitutively active; MLC, myosin light chain; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; SCID, severe combined immunodeficiency.

The Rap 1 effector RIAM regulates complement-dependent phagocytosis

Iria Medraño-Fernández¹, Isabel Olazabal², Elena Rodríguez¹, Francisco Sanchez-Madrid²,
Vassiliki A. Boussiotis³, Pedro A. Reche¹, Carlos Cabañas⁴, Esther M. Lafuente^{1*}

From: **1** Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Department of Microbiology, 28040 Madrid, Spain, and Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre; **2** Servicios de Inmunología, Hospital de la Princesa, 28006 Madrid, Spain; **3** Department of Hematology-Oncology and Cancer Biology Beth Israel Deaconess Medical Center, Center for Life Sciences, Harvard Medical School, 330 Brookline Avenue, Boston MA 02215; **4** Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), 28049 Madrid, Spain.

***Address correspondence to:** Esther M. Lafuente, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología I, 28040 Madrid, Spain, Phone: 34-91-3947271 ; Fax: 34-91-394 1641; e-mail: melafuente@med.ucm.es

Running Title: RIAM controls complement dependent phagocytosis

Key Words: RIAM, Rap1, Talin, phagocytosis, Mac-1, CR3, $\alpha_M\beta_2$